



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

*Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας*

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΘΕΟΦΑΝΗΣ ΜΥΛΩΝΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΘΑΡΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ  
ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *SALVIA SCLAREA* ΚΑΙ *MENTHA  
MICROPHYLLA* ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ  
ΜΗΤΡΑΣ (HEL4) ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ (MCF-7).**



**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

**Μελέτη της επίδρασης καθαρών πολυφαινολικών μορίων από εκχυλίσματα των φυτών *Salvia sclarea* και *Mentha microphylla* σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) και του μαστού (MCF-7).**

**Study of the effect of pure polyphenolic molecules isolated from plant extracts of *Salvia sclarea* and *Mentha microphylla* on cancer cell lines HeLa (cervical cancer cells) and MCF-7 (breast cancer cells).**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Στάγκος:** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Καλλιόπη Λιαδάκη:** Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, πραγματοποιώντας την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο που διευθύνει μέσα σε ένα γόνιμο ακαδημαϊκό περιβάλλον.

Ευχαριστίες οφείλω ιδιαιτέρως στον λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για την πολύτιμη βοήθεια, συμβουλή και καθοδήγηση του απ' αρχής της πειραματικής εργασίας μέχρι και του τελικού σταδίου συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Επίσης να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το εξόχως φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και τους Αντώνη Ματάκο και Λουκά Γεροστέργιο για τη συμβολή τους στη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Τέλος να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και τα αδέρφια μου για την ποικιλόμορφη συμπαράστασή τους σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

## Περίληψη

Είναι κοινός τόπος ότι ο καρκίνος είναι μια σημαντική απειλή για την υγεία συνιστώντας την δεύτερη αιτία θανάτου στον δυτικό κόσμο. Η εκδήλωση του καρκίνου, (όρος που αναφέρεται σε 150-200 διαφορετικές παθήσεις), οφείλεται ως επί το πλείστον σε περιβαλλοντικούς παράγοντες σε κάποιο ποσοστό όμως έχει και γενετική βάση με την έννοια της προδιάθεσης ορισμένων ατόμων για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος περισσότερο διαδεδομένος τύπος καρκίνου μεταξύ των γυναικών. Ξεκινά από προκαρκινικές αλλοιώσεις όπου έγκαιρη αντιμετώπισή τους ανακόπτει την πορεία μετατροπής τους σε τελικούς καρκινικούς όγκους. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών που δεν μπορεί να προληφθεί πρωτογενώς καθώς αγνοούμε ακόμα τον σαφή παράγοντα δημιουργίας του. Οι συνεχιζόμενες διαστάσεις του προβλήματος του καρκίνου σε συνδυασμό με την αποτυχία των συμβατικών χημειοθεραπευτικών μεθόδων πρόβαλλε την απαίτηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η χημειοπροφύλαξη που συνίσταται στην πρόληψη του καρκίνου με τη χρήση ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης είναι ίσως η πιο ελπιδοφόρα προσέγγιση. Ανάμεσα στους κύριους χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες συγκαταλέγονται και οι πολυφαινόλες. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση επτά καθαρών πολυφαινολικών μορίων, που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα των φυτών *Salvia sclarea* και *Mentha microphylla*, στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa (κύτταρα του τραχήλου της μήτρας) και MCF-7 (κύτταρα μαστού). Η εκτίμηση της δράσης τους έγινε με τη μέθοδο του XTT. Τα μόρια που μελετήθηκαν είναι τα: salvianolic acid K, luteolin 3-O-glucuronide, luteolin, luteolin 7-O-glucoside, luteolin 7-O-rutinoside, rosmarinic acid και eriodictyol 7-O-rutinoside. Αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικές με τα παραπάνω μόρια υπάρχουν όσον αφορά τις luteolin, rosmarinic acid και salvianolic acid A,B ενώ πολύ λίγες έως καθόλου για τα υπόλοιπα μόρια. Πιο συγκεκριμένα για την επίδρασή τους στις κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7 υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για τα πρώτα μόρια και καθόλου για τα υπόλοιπα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική δράση όλων των παραπάνω μορίων στην κυτταρική αύξηση και των δύο κυτταρικών σειρών με τιμές  $IC_{50}$  που κυμαίνονταν από 4.5 έως 177  $\mu M$ . Ισχυρότερη δράση παρουσίασαν οι ουσίες luteolin 7-O-glucoside και luteolin 7-O-rutinoside στην κυτταρική σειρά MCF-7 με  $IC_{50}=4.5 \mu M$  αμφότερες, ενώ ισχυρή δράση είχαν και οι πολυφαινόλες rosmarinic acid και eriodictyol 7-O-rutinoside τόσο στα HeLa κύτταρα ( $IC_{50}=33$  και  $40 \mu M$  αντίστοιχα), όσο και στα MCF-7 ( $IC_{50}=70$  και  $23 \mu M$  αντίστοιχα) και η luteolin μόνο στα πρώτα ( $IC_{50}=29 \mu M$ ). Έτσι λοιπόν τα παραπάνω μόρια υποδηλώνουν μια πιθανή χημειοπροφυλακτική δράση. Για να θεωρηθούν όμως ως αξιόπιστοι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες θα πρέπει να ακολουθήσουν και άλλες μελέτες τους, τόσο σε άλλες καρκινικές σειρές όσο και μελέτες που θα εξετάζουν τα επίπεδα ανοχής του οργανισμού σε αυτές καθώς και τους μηχανισμούς αντικαρκινικής δράσης τους.

## Abstract

It is common knowledge that cancer is a serious hazard to health as the second cause of death in the western world. Development of cancer (a general term that can refer to 150-200 different diseases) can be mainly caused by environmental factors but it also has a genetic basis regarding the predisposition of individuals for specific types of tumors. Cervical cancer is the second most common type of cancer among women. It begins with precancerous lesions which however can be slowed or inhibited to grow into true cancers if they are detected and treated early. At the same time, breast cancer is the most common type of cancer among women that can not be prevented as the causing factor is not yet clearly known. The on-growing dimensions of the problem of cancer in combination with the inefficiency of conventional chemotherapeutic treatment methods highlight the need for new therapeutic approaches. Perhaps the most promising approach that has been gaining ground recently is chemoprevention which constitutes the use of substances of natural or artificial origins in order to prevent cancer formation or development. One such very important and promising group of chemopreventive agents is polyphenols. The present study examined the effect of seven pure polyphenolic molecules isolated from plant extracts of *Salvia sclarea* and *Mentha microphylla*, on cancer cell lines HeLa (cervical cancer cells) and MCF-7 (breast cancer cells). Specifically, the compounds that were studied were: salvianolic acid K, luteolin 3-O-glucuronide, luteolin, luteolin 7-O-glucoside, luteolin 7-O-rutinoside, rosmarinic acid and eriodictyol 7-O-rutinoside. The method used in order to assess and measure their effect was XTT cell proliferation assay. In literature, there are some studies on the anti-carcinogenic activity of luteolin, rosmarinic acid and salvianolic acid A,B but very few to no studies exist for the rest of the compounds. The results of this study show an inhibitory effect of all these molecules on the cell growth of both cell lines with IC<sub>50</sub> values ranging from 4.5 to 177 µMol. The strongest effects were caused by luteolin 7-O-glucoside and luteolin 7-O-rutinoside in MCF-7 cell line (IC<sub>50</sub> = 4.5 µMol). Strong effect have also polyphenols rosmarinic acid and eriodictyol 7-O-rutinoside on both HeLa cells (IC<sub>50</sub> = 33 µMol and 40 µMol respectively) and on MCF-7 cells (IC<sub>50</sub> = 70 µMol and 23 µMol respectively) as well as luteolin but only on HeLa cells (IC<sub>50</sub> = 29 µMol). Thus, the results from this study suggest that these molecules can exhibit some chemopreventive effect. However, in order for them to be regarded as reliable chemopreventive agents, complementary studies should take place on other cell lines as well as studies that will examine the tolerance levels of the organism and will also focus on their tumor preventing mechanisms of action.

## Περιεχόμενα

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>11</b>
<b>1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	<b>11</b>
1.1.1. Καρκινογένεση	11
1.1.2. Πολυσταδιακή διαδικασία επαγωγής του καρκίνου Σταδιοποίηση του καρκίνου.	13
1.1.3. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	14
1.1.4. Καρκίνος του μαστού	18
<b>1.2. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ</b>	<b>21</b>
1.2.1 Γενικά	21
1.2.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	23
<b>1.3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ</b>	<b>27</b>
1.3.1. Γενικά	27
1.3.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών	28
1.3.2.1. Φλαβονοειδή	28
1.3.2.2. Μη Φλαβονοειδή	32
1.3.3. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών	33
<b>1.4. ΧΕΙΛΑΝΘΗ</b>	<b>34</b>
1.4.1. Η οικογένεια των χειλανθών [Lamiaceae ή Labiatae]	34
1.4.2. Φασκόμηλο ( <i>Salvia spp.</i> )	35
1.4.2.1. Βοτανικά στοιχεία	35
1.4.2.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	36
1.4.2.3. Καθαρά μόρια <i>Salvia sclarea</i>	38
1.4.3. Μέντα ( <i>Mentha spp.</i> )	40
1.4.3.1. Βοτανικά στοιχεία	40

1.4.3.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	41
1.4.3.3. Καθαρά μόρια <i>mentha microphylla</i>	42
1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	45
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
2.1. ΥΛΙΚΑ	45
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	45
2.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος	45
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.2.1. Καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7.	47
2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT	47
2.2.2.1. Αρχή μεθόδου	47
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	48
2.2.3. Στατιστική ανάλυση	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72



### Περιεχόμενα εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> <i>HeLa</i> κύτταρα από καλλιέργεια του εργαστηρίου όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.	<b>17</b>
<b>Εικόνα 2:</b> <i>MCF-7</i> κύτταρα από εργαστηριακή καλλιέργεια όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.	<b>21</b>
<b>Εικόνα 3:</b> Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών.	<b>33</b>
<b>Εικόνα 4 :</b> <i>salvia sclarea</i>	<b>36</b>
<b>Εικόνα 5 :</b> χημική δομή <i>salvianolic acid K</i>	<b>38</b>
<b>Εικόνα 6:</b> χημική δομή λουτεολίνης	<b>40</b>
<b>Εικόνα 7:</b> <i>mentha microphylla</i>	<b>41</b>
<b>Εικόνα 8:</b> χημική δομή <i>luteolin 7-O-glucoside</i>	<b>42</b>
<b>Εικόνα 9:</b> χημική δομή <i>luteolin 7-O-rutinoside</i>	<b>43</b>
<b>Εικόνα 10:</b> χημική δομή ροσμαρινικού οξέος	<b>44</b>
<b>Εικόνα 11:</b> χημική δομή <i>eriodictyol 7-O-rutinoside</i>	<b>44</b>
<b>Εικόνα 12 :</b> μεταβολισμός του <i>XTT</i> σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.	<b>48</b>

### Περιεχόμενα πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Ταξινόμηση και χημικές δομές των φλαβονοειδών.	<b>30</b>
<b>Πίνακας 2:</b> φυτικές πολυφαινόλες από <i>Salvia sclarea</i> και <i>Mentha microphylla</i> .	<b>46</b>

### **Περιεχόμενα γραφημάτων**

<b>Γράφημα 1:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από το salvianolic acid K (Ess1).	<b>51</b>
<b>Γράφημα 2:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin 3-O-glucuronide (Ess3).	<b>52</b>
<b>Γράφημα 3:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin (Ess8).	<b>53</b>
<b>Γράφημα 4:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin 7-O-glucoside (Kmm1).	<b>54</b>
<b>Γράφημα 5:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin 7-O-rutinoside (Kmm2).	<b>55</b>
<b>Γράφημα 6:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από το Rosmarinic acid (Kmm4).	<b>56</b>
<b>Γράφημα 7:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από την eriodictyol 7-O-rutinoside (Kmm5).	<b>57</b>
<b>Γράφημα 8:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το salvianolic acid K (Ess1).	<b>58</b>
<b>Γράφημα 9:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin 3-O-glucuronide (Ess3).	<b>59</b>
<b>Γράφημα 10:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin (Ess8).	<b>60</b>
<b>Γράφημα 11:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin 7-O-glucoside (Kmm1).	<b>61</b>
<b>Γράφημα 12:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin 7-O-rutinoside (Kmm2).	<b>62</b>
<b>Γράφημα 13:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Rosmarinic acid (Kmm4).	<b>63</b>
<b>Γράφημα 14:</b> % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από την eriodictyol 7-O-rutinoside (Kmm5).	<b>64</b>
<b>Γράφημα 15:</b> Οι τιμές IC <sub>50</sub> των πολυφαινολών συγκριτικά στις δύο κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7.	<b>65</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.1.1. Καρκινογένεση

Καρκινογένεση ή ογκογένεση είναι στην ουσία η διαδικασία δημιουργίας του καρκίνου. Η παραγωγή και ανανέωση των κυττάρων γίνεται με θαυμαστή αρμονία και τάξη. Μερικές φορές ωστόσο, ο έλεγχος της παραγωγής των κυττάρων διαταράσσεται και μερικά κύτταρα μιας περιοχής παράγονται σε υπερβολικά μεγάλο αριθμό σχηματίζοντας μια ανώμαλη μάζα, τον όγκο. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, γνωστού ως απόπτωση, διατηρείται με αυστηρά ρυθμιζόμενες διαδικασίες που διασφαλίζουν την ακεραιότητα των οργάνων και των ιστών. Μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό που διακόπτουν αυτή την φυσιολογική διαδικασία απορρυθμίζοντας τον φυσιολογικό προγραμματισμό της οδηγούν στην καρκινογένεση. Περισσότερες μιας μετάλλαξης απαιτούνται για την καρκινογένεση. Γενικά αλλαγές σε πολλά γονίδια και μάλιστα μεταλλάξεις σε συγκεκριμένους τύπους γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση είναι απαραίτητες προκειμένου ένα φυσιολογικό κύτταρο να μεταβληθεί σε καρκινικό ( Fearon ER, Vogelstein B. 1990, Croce CM. 2008, Knudson AG. 2001). Οι γενετικές αλλαγές μπορεί να συμβούν σε πολλά επίπεδα, από την προσθήκη ή την έλλειψη ολόκληρου χρωμοσώματος σε μεταλλαγή που επηρεάζει ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Υπάρχουν δύο κατηγορίες γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα στην διαδικασία της καρκινογένεσης, τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Είναι απίθανο να καθοριστεί η πρωταρχική αιτία για τους περισσότερους ειδικούς καρκίνους. Σε λίγες περιπτώσεις υπάρχει μια αιτία π.χ. σε κάθε περίπτωση το σάρκωμα Kaposi προκαλείται από τον ιό HHV-8. Παρά ταύτα με τη βοήθεια επιδημιολογικών τεχνικών και πληροφοριών είναι πιθανή η εκτίμηση των αιτιών σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου. Όλα τα νεοπλάσματα είναι συνήθως αναπτύξεις κλώνων, κατά τις οποίες τα κύτταρα του όγκου αποτελούν τους απογόνους ενός προγονικού κυττάρου, που έχει υποστεί ένα αρχικό γεγονός εξαλλαγής και άρχισε να πολλαπλασιάζεται ανώμαλα. Με την πάροδο του χρόνου έχουμε δευτερογενείς αλλοιώσεις στο γονότυπο των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τα κύτταρα ενός

όγκου σε προχωρημένο στάδιο να παρουσιάζουν μεγάλη γονοτυπική ετερογένεια, ιδιαίτερα των συμπαγών νεοπλασμάτων.

Ανάλογα με τη συμπεριφορά και τη φύση τους οι όγκοι διακρίνονται σε καλοήθεις και κακοήθεις, ενώ ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησής τους από τον ιστό από τον οποίο προέρχονται, διακρίνονται σε ανώτερης, μέσης, κατώτερης διαφοροποίησης και σε αναπλαστικούς όγκους, όταν η διαφοροποίηση έχει χαθεί και σημειώνεται ποικιλία στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων και των πυρήνων τους. Όσο περισσότερο αδιαφοροποίητος είναι ένας όγκος, τόσο αυξάνεται η επιθετικότητά του. Τέλος ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται, οι όγκοι διακρίνονται σε αυτούς με επιθηλιακή και σε αυτούς με μεσεγχυματική προέλευση. Οι καλοήθεις όγκοι συνήθως, περιβάλλονται από κάψα, παραμένουν εντοπισμένοι και χαρακτηρίζονται ως ανώτερης διαφοροποίησης χωρίς να προκαλούν απειλητικά για τη ζωή προβλήματα. Οι καλοήθεις όγκοι του καλυπτήριου επιθηλίου ονομάζονται θηλώματα, του αδενικού επιθηλίου αδενώματα και οι κυστικοί όγκοι κυσταδενώματα. Ένας καλοήθης όγκος μπορεί να εξαλλαχθεί σε κακοήγη σε κάποιες περιπτώσεις. Οι κακοήθεις όγκοι έχουν ένα ταχύ δυναμικό ανάπτυξης, μπορούν να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς και να δίνουν απομακρυσμένες μεταστάσεις με αποτέλεσμα μη έγκαιρη αντιμετώπιση τους να προκαλεί το θάνατο. Το μεγαλύτερο ποσοστό τους (80%) είναι επιθηλιακής προέλευσης, στερεοί όγκοι. Το 10% προέρχονται από λεμφικό ή αιμοποιητικό ιστό (λεμφώματα ή λευχαιμίες αντίστοιχα), ενώ υπάρχει και ένα σημαντικό ποσοστό όγκων νευροενδοκρινούς προέλευσης. Βέβαια όγκοι στο ανθρώπινο σώμα είχαν περιγραφεί από Αιγύπτιους πριν χιλιάδες χρόνια, ενώ μετά το 400 π.Χ. περιγραφές θανατηφόρων όγκων έχουμε από Έλληνες και Ρωμαίους μελετητές. Κατά την πλειονότητά της (>70%) η εκδήλωση του καρκίνου οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (καρκινογόνα μόρια στα τρόφιμα και την ατμόσφαιρα, δίαιτα, κάπνισμα κ.α.), σε ένα ποσοστό όμως παραμένει γενετικό νόσημα, όχι με την αυστηρή έννοια του όρου αλλά ως μεγαλύτερη προδιάθεση ορισμένων ομάδων πληθυσμού για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου. (Σκορίλας Α. 2008).

Αρκετές εναλλακτικές θεωρίες καρκινογένεσης, ωστόσο, βασίζονται σε επιστημονικές αποδείξεις και αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο. Έτσι μερικοί επιστήμονες πιστεύουν ότι ο καρκίνος μπορεί να προέρχεται από επιγενετικές αλλαγές (κληρονομικές και αντιστρεπτές αλλαγές εκτός της αλληλουχίας του DNA),( Jaffe LF, 2003) ή ανευπλοειδία (αριθμητικές και δομικές ανωμαλίες σε

χρωμοσώματα),( Rasnick D, Duesberg PH. 1999), περισσότερο από ότι από μεταλλάξεις. Ο καρκίνος έχει επιπλέον θεωρηθεί ως μεταβολική ασθένεια κατά την οποία επισυμβαίνει εκτροπή του μονοπατιού παραγωγής ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αερόβια γλυκόλυση και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που προκαλούν οξειδωτικό στρες ( López-Lázaro M. 2010). Οι τελευταίες αυτές θεωρίες θεωρούνται πλέον ως συμπληρωματικές των κλασσικών.

### **1.1.2. Πολυσταδιακή διαδικασία επαγωγής του καρκίνου-Σταδιοποίηση του καρκίνου.**

Η γνώση της εξελικτικής φυσιολογίας του καρκίνου προσφέρει σημαντική πληροφόρηση σχετικά με την πορεία της κακοήθειας. Μεγάλος αριθμός εργασιών δείχνει ότι τα γονιδιώματα των καρκινικών κυττάρων έχουν υποστεί βλάβες σε πολλά τμήματά τους, τόσο λόγω σημειακών μεταλλάξεων όσο και εξαιτίας αλλοιώσεων σε ολόκληρα χρωμοσώματα. Σύμφωνα με το μοντέλο των «πολλαπλών χτυπημάτων» (multiple-hit model), αρχικά μια βλάβη σε ένα κύτταρο του δίνει ένα μικρό πλεονέκτημα αύξησης. Ένα από τα προγονικά κύτταρα στη συνέχεια θα μπορούσε να υποστεί μια δεύτερη μετάλλαξη που θα επέτρεπε στον απόγονό του να αναπτυχθεί με λιγότερο έλεγχο και να σχηματίσει ένα μικρό καλοήγη όγκο. Μια τρίτη μετάλλαξη σε ένα κύτταρο μέσα στον όγκο θα είχε ως αποτέλεσμα οι απόγονοι του κυττάρου να σχηματίσουν μια μάζα από κύτταρα, καθένα από τα οποία θα περιέχει αυτές τις τρεις μεταλλάξεις. Μια επιπρόσθετη μετάλλαξη σε ένα από αυτά τα κύτταρα θα επέτρεπε στους απογόνους του να εισχωρήσουν στην κυκλοφορία του αίματος και να εγκαταστήσουν θυγατρικές αποικίες σε άλλες απομακρυσμένες θέσεις, στοιχεία χαρακτηριστικά του μεταστατικού καρκίνου. Καθώς απαιτούνται δεκαετίες για να συμβούν αυτές οι πολλαπλές μεταλλάξεις, η εκθετική αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου σχετίζεται με την ηλικία (Σκορίλας Α. 2008)

Η εκδήλωση του καρκίνου μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα στάδια:

- Φάση πρόκλησης. Στις περισσότερες μορφές καρκίνου το στάδιο αυτό διαρκεί 15-30 χρόνια, στην διάρκεια του οποίου το άτομο εκτίθεται σε καρκινογόνα ή υπόκειται σε τυχαίες μεταλλάξεις.
- In situ (τοπική) φάση. Είναι στάδιο που διαρκεί 5-10 χρόνια κατά το οποίο προκαρκινικές αλλοιώσεις επηρεάζουν τους ιστούς.

- Φάση διήθησης. Σε αυτό το στάδιο τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται σε βαθύτερους ιστούς φθάνοντας ως τα λεμφικά και τα αιμοφόρα αγγεία. Η διήθηση μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη πίεση που ασκεί ο όγκος, στη μεγαλύτερη κίνηση των κυττάρων του και στη μικρότερη συνάφεια μεταξύ τους, στην απουσία μεσοκυττάρων γεφυρών και στην παραγωγή κυτταρολυτικών ουσιών από τα καρκινικά κύτταρα. Η φάση διήθησης μπορεί να διαρκέσει από 1-5 χρόνια.
- Φάση διασποράς. Αποτελεί το στάδιο δημιουργίας μεταστάσεων σε άλλους ιστούς. Η διασπορά μπορεί να γίνει είτε μέσω του λεμφικού συστήματος (λεμφογενής διασπορά), είτε μέσω του κυκλοφορικού συστήματος (αιματογενής διασπορά). (Σκορίλας Α. 2008)

Καθώς ο όγκος αυξάνεται, επεκτείνεται και γίνεται προοδευτικά ανίατος, υπάρχουν τρεις σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να υπολογιστούν:

- Η έκταση του τοπικού όγκου (Tumor).
- Η παρουσία ή απουσία μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες και ο βαθμός συμμετοχής τους (Nodes).
- Η παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (Metastasis).

Το σύστημα TNM καθορίστηκε από τη Διεθνή Ένωση Κατά του Καρκίνου (International Union Against Cancer-UICC) και σήμερα έχει γίνει σταδιοποίηση όλων των καρκίνων με αυτό το σύστημα από ειδικές επιτροπές. Αν και αυτή η σταδιοποίηση είναι κλινική και όχι τόσο ακριβής όσο η παθολογοανατομική εξέταση των λεμφαδένων και άλλων ιστών, είναι ικανοποιητική σε διεθνές επίπεδο (Σκορίλας Α. 2008).

### **1.1.3. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας**

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας ευθύνεται για τον θάνατο 274.000 γυναικών κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο και είναι η δεύτερη περισσότερο διαδεδομένη μορφή καρκίνου των γυναικών. Στην Ευρώπη 33.500 γυναίκες προσβάλλονται κάθε χρόνο, ενώ από αυτές οι 15.000 πεθαίνουν. Ο τράχηλος συνδέει το σώμα της μήτρας με τον κόλπο και έχει δύο κύριους τύπους κυττάρων, τα πλακώδη κύτταρα στον έξω-τράχηλο και τα αδενώδη κύτταρα στον ένδο-τράχηλο. Το σημείο συνάντησης αυτών

των δύο κυτταρικών τύπων ονομάζεται ζώνη μετάπτωσης και αποτελεί το σημείο έναρξης των περισσότερων καρκίνων του τραχήλου. Οι περισσότεροι καρκίνοι ξεκινούν από τα κύτταρα που καλύπτουν τον τράχηλο. Αυτά δεν μετατρέπονται απευθείας σε καρκινικά, αλλά προηγούνται σταδιακές προ-καρκινικές αλλοιώσεις σε αυτά που τα μετατρέπουν σε καρκινικά. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι κυρίως η τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN), η πλακώδης ενδοεπιθηλιακή βλάβη (SIL) και διαφόρων μορφών δυσπλασίες. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να ανιχνευθούν από το τεστ Παπανικολάου και να θεραπευτούν, ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη του καρκίνου. Οι καρκίνοι του τραχήλου και οι προ-καρκινικές αλλοιώσεις ταξινομούνται ανάλογα με την μικροσκοπική εικόνα τους. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι καρκίνων του τραχήλου: το πλακώδες κυτταρικό καρκίνωμα και το αδеноκαρκίνωμα. Το 80%-90% των καρκίνων του τραχήλου είναι της πρώτης μορφής και προέρχονται από τα πλακώδη κύτταρα που καλύπτουν την επιφάνεια του έξω-τραχήλου. Τα αδеноκαρκινώματα του τραχήλου ήταν περισσότερο κοινά στο παρελθόν και προέρχονται από τα βλεννώδη αδενικά κύτταρα του ένδο-τραχήλου. Περισσότερο σπάνιες είναι περιπτώσεις που έχουν χαρακτηριστικά και των δύο τύπων και αναφέρονται ως μικτοί τύποι. Παρόλο που οι καρκίνοι του τραχήλου προέρχονται από κύτταρα που παρουσιάζουν προ-καρκινικές αλλοιώσεις, εντούτοις μόνο μερικές γυναίκες που εμφανίζουν τέτοιες αλλοιώσεις θα αναπτύξουν καρκίνο. Η μετάβαση από την προ-καρκινική κατάσταση στην καρκινική συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα προ-καρκινικά κύτταρα εξαλείφονται χωρίς θεραπευτική αγωγή. Σε κάποιες ωστόσο οι προ-καρκίνοι μετατρέπονται σε αληθείς διηθητικούς καρκίνους. Επεμβαίνοντας στο αρχικό στάδιο και θεραπεύοντας όλους τους προ-καρκίνους μπορούμε να προλάβουμε σχεδόν όλους τους αληθείς καρκίνους. Ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελούσε στο παρελθόν πολύ κοινή ασθένεια στις ΗΠΑ και την Ευρώπη. Η ανακάλυψη όμως του Pap test που αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο προληπτικού ελέγχου και η ευρεία χρησιμοποίησή του οδήγησε στην μείωση του ποσοστού αυτού του τύπου καρκίνου στον δυτικό κόσμο κατά 70%. Βέβαια στα αναπτυσσόμενα κράτη λόγω έλλειψης προγραμμάτων πρόληψης, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί ακόμα μια πολύ σοβαρή ασθένεια. Ως κύριοι ενοχοποιητικοί παράγοντες εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας θεωρούνται οι λοιμώξεις με τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Οι HPV είναι μια ομάδα από 100 περίπου ιούς που προκαλούν μολύνσεις σε μια ποικιλία περιοχών του σώματος συμπεριλαμβανομένου και του τραχήλου.

Τραχηλικά στελέχη του ιού HPV διαχωρίζονται σε κατηγορίες «υψηλού» και «χαμηλού» κινδύνου αναλόγως της συσχέτισής τους με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Το 2007 ήταν ξεχωριστή χρονιά για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας καθώς δόθηκε στην κυκλοφορία το εμβόλιο γνωστό ως «Cervarix» και το οποίο μπορεί να χορηγηθεί σε κοπέλες ηλικίας 9-26 ετών. Το εμβόλιο κατά του HPV έχει υψηλή αποτελεσματικότητα στην πρόληψη μόνιμης μόλυνσης και ασθενειών του τραχήλου που σχετίζονται με διάφορους τύπους του HPV στις νέες γυναίκες. Είναι ασφαλές και γενικά καλά ανεκτό. Ο εμβολιασμός των έφηβων γυναικών εμφανίζεται ως το πιο αποτελεσματικό μέσο για την προστασία έναντι των ασθενειών του τραχήλου και του καρκίνου (Beibei Lu et al., 2011). Το κάπνισμα επίσης ενοχοποιείται ελαφρώς για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, με αποτέλεσμα οι καπνίστριες να έχουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου από τις μη καπνίστριες.

Γενικότερα αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχουν οι γυναίκες που:

- 1) έχουν αυξημένη σεξουαλική δραστηριότητα - είτε άρχισαν τις σχέσεις σε μικρή ηλικία, είτε έχουν πολλούς συντρόφους
- 2) έχουν προσβληθεί από ορισμένες νόσους, όπως η μόλυνση από τον ιό του έρπητα τύπου II
- 3) βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή μετά από μεταμόσχευση οργάνου
- 4) και γυναίκες που η μητέρα τους πήρε το φάρμακο διαιθυλοστιλβεστρόλη (DES) κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης.(Παπαβασιλείου Κ. 1991).

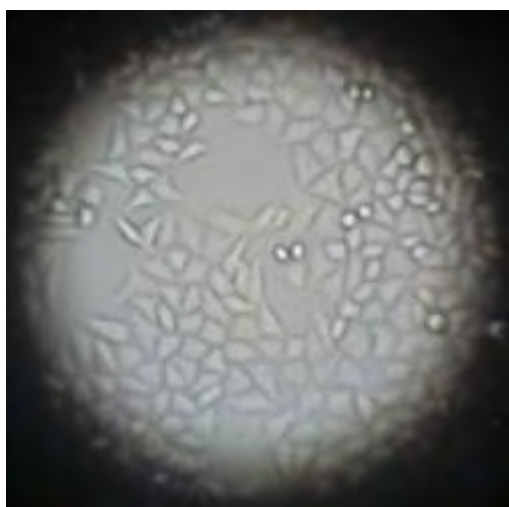
Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας έχει αργή ανάπτυξη και διακρίνεται σε πέντε στάδια:

0. Ενδοεπιθηλιακός καρκίνος in situ, δηλαδή μη διηθητικός καρκίνος
1. Αρχόμενος καρκίνος
2. Προχωρημένος καρκίνος
3. Κατάσταση βαριά
4. Κατάσταση μη αναστρέψιμη με μεταστάσεις. (Παπαβασιλείου Κ. 1991).



Η θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Έτσι αν είναι περιορισμένος στο επιθήλιο του τραχήλου, τότε το παθολογικό τμήμα του ιστού μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά ή να καταστραφεί με κρυοπηξία ή laser. Σε περίπτωση διηθητικού καρκίνου μπορεί να απαιτηθεί εγχείρηση για την αφαίρεση του προσβεβλημένου ιστού και των οργάνων και ακολούθως ακτινοθεραπεία για την εξουδετέρωση των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων. Χρήσιμες είναι και οι βιολογικές θεραπείες (π.χ. ιντερφερόνη), ενώ στην περίπτωση που υπάρχουν μεταστάσεις μπορεί να είναι απαραίτητη η χημειοθεραπεία.

Τα HeLa είναι μια καρκινική σειρά κυττάρων του τραχήλου της μήτρας που πήραν το όνομά τους από τα αρχικά του ονόματος της πρώτης ασθενούς με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Henrietta Lacks) στις αρχές του 1950. Ανήκαν σε μια Αφροαμερικάνα του Αμερικάνικου Νότου που εργάζονταν ως καπνεργάτρια. Πέθανε το 1951 σε ηλικία 31 ετών από μια μορφή καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο γιατρός της κράτησε δείγμα των καρκινικών κυττάρων τα οποία καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο. Ήταν η πρώτη φορά που κύτταρα επιζούσαν εκτός του ανθρώπινου σώματος. Τελικά έμελλε να αποτελέσουν ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία της βιοϊατρικής έρευνας με τη χρησιμοποίησή τους σε πολλούς ερευνητικούς τομείς και χιλιάδες ερευνητικές εργασίες.



**Εικόνα 1:** *HeLa κύτταρα από καλλιέργεια του εργαστηρίου όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.*

#### 1.1.4. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι αυτός ο τύπος καρκίνου που αναπτύσσεται στους γαλακτοπαραγωγούς αδένες του μαστού ή στους γαλακτοφόρους πόρους που μεταφέρουν το γάλα. Οι καρκίνοι που προέρχονται από τους πόρους αναφέρονται ως πορώδεις καρκίνοι, ενώ αυτοί που προέρχονται από τους λοβούς ως λοβοειδείς καρκίνοι. Το μέγεθος, το στάδιο, ο ρυθμός ανάπτυξης και άλλα χαρακτηριστικά του όγκου καθορίζουν και το είδος της θεραπείας. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση, φαρμακευτική αγωγή (ορμονική θεραπεία ή χημειοθεραπεία), ακτινοβολήση και/ή ανοσοθεραπεία.( Florescu A. 2011). Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών με περίπου 1.000.000 νέα κρούσματα παγκοσμίως. Συνιστά το 22.9% μεταξύ όλων των τύπων καρκίνων, (εκτός των μη μελανοματοειδών καρκίνων του δέρματος), που εμφανίζονται στις γυναίκες, ενώ το 2008 σε αυτόν οφείλονταν το 13.7% των θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες ( "World Cancer Report", 2008 ). Υπολογίζεται ότι μία στις οκτώ γυναίκες θα εμφανίσει κάποια στιγμή της ζωής της αυτό τον τύπο καρκίνου.

Μεταξύ των συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο του μαστού είναι και τα παρακάτω:

- Εξόγκωμα ή σκλήρυνση στην περιοχή του μαστού ή και της μασχάλης
- Διόγκωση λεμφαδένων της μασχάλης
- Έκκριση υγρών από τη θηλή
- Έλξη του δέρματος ή της θηλής προς το εσωτερικό του μαστού
- Ερυθρότητα, ευαισθησία ή πόνοι στο στήθος

Τα αίτια για τον καρκίνο του μαστού δεν είναι ξεκάθαρα, ενώ ως παράγοντες κινδύνου έχουν αναφερθεί οι ακόλουθοι:

- Το φύλο. Σαφώς υπερτερεί το γυναικείο φύλο με την συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες να είναι 100 φορές μικρότερη.
- Η ηλικία. Τα ποσοστά εμφάνισής του αυξάνονται όσο αυξάνεται η ηλικία, με τις περισσότερες περιπτώσεις να εμφανίζονται μετά την ηλικία των 50 ετών, ενώ να είναι σπάνιες αυτές κάτω των 35 ετών.

- Η κληρονομικότητα. Μόλις το 5-10% των περιπτώσεων αποδίδονται σε κληρονομική προδιάθεση, όπου εμπλέκονται τα γονίδια BRCA 1 και BRCA2 . Επιπλέον η ύπαρξη συγγενών με καρκίνο του μαστού, είτε στην οικογένεια της μητέρας, είτε στην οικογένεια του πατέρα ίσως αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στη γυναίκα, καθώς και άλλων τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένων του εγκεφάλου και των πνευμόνων.( Medew Julia. 2010).
- Διαταραχές της έμμηνου ρύσης. Έτσι γυναίκες με πρόωμη έναρξη της έμμηνου ρύσης (πριν το δωδέκατο έτος της ηλικίας) και γυναίκες με καθυστερημένη εμμηνόπαυση (μετά τα 55) αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Επίσης αυξημένος κίνδυνος υπάρχει σε περιπτώσεις λήψης οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση, ατεκνίας και μη γαλουχίας.
- Το αλκοόλ. Η κατανάλωση οινοπνευματωδών αυξάνει τα επίπεδα των οιστρογόνων στο αίμα, αυξάνοντας παράλληλα και την πιθανότητα καρκινογένεσης.
- Άλλοι παράγοντες υψηλού κινδύνου συνιστούν η φυλή, η διαίτα (πλούσια σε λιπαρά, φτωχή σε ιώδιο), η παχυσαρκία, το κάπνισμα, η ακτινοβολία και η οικονομική κατάσταση ( Venturi S. 2001, Aceves C, et al 2005, Stoddard Fr, et al 2008, Chlebowski RT, et al 2006 ).

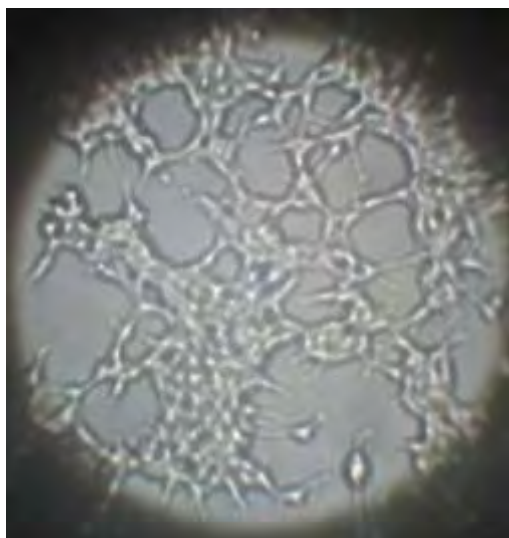
Γενικά ο καρκίνος του μαστού δεν μπορεί να προληφθεί πρωτογενώς καθώς αγνοούμε ακόμα τον σαφή παράγοντα δημιουργίας του. Δευτερογενώς όμως η πρόληψη που στηρίζεται στην αυτοεξέταση, την κλινική εξέταση και τη μαστογραφία μπορεί να μας οδηγήσει σε έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία.

Η σταδιοποίηση της νόσου έχει ιδιαίτερη αξία τόσο για την πρόγνωση όσο και για την θεραπεία. Ακολουθώντας την σταδιοποίηση κατά TNM (T: μέγεθος πρωτογενούς όγκου, N: προσβολή λεμφαδένων της μασχάλης, M: παρουσία ή όχι μεταστάσεων) έχουμε τα ακόλουθα 5 στάδια:

1. Στάδιο 0. Εντοπίζεται στο σημείο προέλευσης χωρίς διήθηση στους γύρω ιστούς και διασπορά.

2. Στάδιο I. Όγκος μεγέθους 2 εκατοστών ή μικρότερος χωρίς ένδειξη διασποράς.
3. Στάδιο IIΑ. Όγκος μεγέθους 2-5 εκατοστών χωρίς διασπορά στους λεμφαδένες.  
Στάδιο IIΒ. Όγκος 2-5 εκατοστών με θετικούς λεμφαδένες ή όγκος >5 εκατοστών χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις.
4. Στάδιο IIIΑ. Όγκος >5 εκατοστών και προσβολή των μασχαλιαίων λεμφαδένων που συμφύονται μεταξύ τους ή με άλλους ιστούς.  
Στάδιο IIIΒ. Προσβεβλημένοι θωρακικοί λεμφαδένες και όγκος που επεκτείνεται στο θωρακικό τοίχωμα ή προσβάλλει το δέρμα.
5. Στάδιο IV. Διασπορά στους λεμφαδένες και απομακρυσμένες μεταστάσεις ή προσβολή του δέρματος και του θωρακικού τοιχώματος πέραν του μαστού.

Η MCF-7 καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού απομονώθηκε το 1970 από μια 69χρονη καυκάσια γυναίκα που πέθανε. Πήρε το όνομά της από το Michigan Cancer Foundation, που αναφέρεται στο ινστιτούτο στο Ντιτρόιτ όπου η κυτταρική σειρά εγκαταστάθηκε από τον Herbert Soule και τους συνεργάτες του το 1973 (Soule HD, et al. 1973). Η καρκινική αυτή σειρά αφορά διηθητικό πορώδες καρκίνωμα του μαστού, προέρχεται από τον υδροθώρακα, έχει παρουσία υποδοχέων οιστρογόνου και προγεστερόνης, αποκρίνεται στα οιστρογόνα, δεν ενισχύει το γονίδιο ERBB2, προκαλεί όγκο στα ποντίκια με την ενίσχυση οιστρογόνων και έχει φαινότυπο οφθαλμικού επιθηλίου (Levenson AS, Jordan VC, 1997, Lacroix M, Leclercq G, 2004, Ross DT, Perou CM, 2001, Charafe-Jauffret E, et al. 2006, Lacroix M, et al. 2006). Αυτή η κυτταρική σειρά διατηρεί μερικά χαρακτηριστικά του διαφοροποιημένου μαστικού επιθηλίου μεταξύ των οποίων την ικανότητα υποδοχής της οιστραδιόλης δια των κυτταροπλασματικών υποδοχέων οιστρογόνου και αποτέλεσε την πηγή μεγάλου ποσοστού της σύγχρονης γνώσης σχετικά με τον καρκίνο του μαστού.



**Εικόνα 2:** *MCF-7 κύτταρα από εργαστηριακή καλλιέργεια όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.*

## 1.2. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

### 1.2.1 Γενικά

Παρά την μεγάλη πρόοδο που έχει συντελεστεί στην βασική επιστημονική γνώση σχετικά με τον καρκίνο καθώς και την κλινική αντιμετώπιση και ίαση κάποιων κακοηθειών (κάποιες μορφές λευχαιμιών και λεμφωμάτων) είναι γεγονός πως ο στόχος της μείωσης κατά 50% της συνολικής θνησιμότητας από καρκίνο μέχρι το έτος 2000, που είχε θέσει το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ, δεν επιτεύχθηκε (Sporn M.B. 1996). Αντιθέτως ο ρυθμός θνησιμότητας κάποιων μορφών καρκίνου συνέχισε να αυξάνει. Προς το παρόν η βασική και κλινική έρευνα στον καρκίνο οδηγούνται από το λανθασμένο στόχο της ίασης προχωρημένων ασθενειών, μια προσέγγιση συχνά μη ρεαλιστική εξαιτίας της γενετικής ετερογένειας και έκτασης των όγκων προχωρημένου σταδίου (Sporn MB, Suh N. 2000). Επιπλέον δεδομένης της γενοτυπικής και φαινοτυπικής ετερογένειας προχωρημένων μορφών κακοήθειας ξεχωριστών περιπτώσεων, υπάρχει μεγάλη ασάφεια όσον αφορά τους μοριακούς και κυτταρικούς στόχους που πρέπει να τεθούν για επιτυχημένη θεραπεία. Μια ανατομικά προσδιορισμένη βλάβη στην πραγματικότητα περιέχει πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, καθένας με το δικό του γονότυπο και φαινότυπο. Επιπροσθέτως η αντίληψη του καρκίνου ως ασθένειας με κυριότερο χαρακτηριστικό

την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση οδήγησε να δοθεί έμφαση στην ανάπτυξη κυτταροτοξικών φαρμάκων τα οποία όμως είναι τοξικά και σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιστών όπως του γαστρεντερικού σωλήνα, του μυελού των οστών, της καρδιάς, των πνευμόνων, των νεφρών και του εγκεφάλου. Ιατρογενής ανεπάρκεια των παραπάνω ιστών αποτελεί συχνά την αιτία θανάτου από καρκίνο. Έτσι λοιπόν οι συνεχιζόμενες διαστάσεις του προβλήματος του καρκίνου και η αποτυχία των συμβατικών χημειοθεραπευτικών προσεγγίσεων σε εξελιγμένες διηθητικές ασθένειες να μειώσουν αποτελεσματικά τα ποσοστά θνησιμότητας, υποδεικνύει ότι απαιτούνται νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου.

Μια σοβαρή εναλλακτική προσέγγιση αντιμετώπισης του προβλήματος του καρκίνου είναι η χημειοπροφύλαξη. Χημειοπροφύλαξη (ή χημειοπροστασία) είναι η πρόληψη του καρκίνου στους ανθρώπινους πληθυσμούς μέσω της πρόσληψης μη τοξικών χημικών ουσιών που αναστέλλουν, αντιστρέφουν ή καθυστερούν τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Αποσκοπεί στην ελάττωση του κινδύνου καρκίνου με τη χρήση ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης ( Sporn M.B, et al 1976). Η χημειοπροφύλαξη διαφέρει από την πρόληψη. Ενώ η πρόληψη αναφέρεται στην αλλαγή συνηθειών (καλύτερη διατροφή, άσκηση, αποφυγή καπνίσματος), η χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση χαπιών ή συμπληρωμάτων διατροφής τα οποία περιέχουν τα υποτιθέμενα ενεργά συστατικά διατροφικών πηγών, όπως φρούτα και λαχανικά (Κωνσταντίνου Α., 2008).

Η καρκινογένεση παρομοιάζεται με ένα ‘παγόβουνο’. Δημιουργείται σταδιακά και μακροχρονίως. Όταν επιτέλους η κορυφή του ανιχνευτεί με τις διαγνωστικές μεθόδους τότε προσπαθούμε να το καταστρέψουμε με βίαια μέσα (χημειοθεραπευτικές τοξικές ουσίες, εγχειρήσεις και ακτινοθεραπείες). Βέβαια δεν καταστρέφεται διότι ο μεγαλύτερός του όγκος είναι ‘κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας’ και εμείς με τις καθιερωμένες προσεγγίσεις κτυπάμε μόνο την κορυφή του ‘παγόβουνου’. Αντίθετα με τις νέες προσεγγίσεις της χημειοπροφύλαξης επιδιώκουμε να καταστρέψουμε το κακό στη ρίζα του. Γνωρίζοντας τους μοριακούς μηχανισμούς δημιουργίας του καρκίνου, προσπαθούμε να αναστείλουμε ή να εμποδίσουμε τα αρχικά στάδια (όπως την εισδοχή των καρκινογόνων ουσιών στα κύτταρα, την ενεργοποίηση των προκαρκινικών ουσιών σε καρκινικές, τον αχαλίνωτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων κλπ.), (Κωνσταντίνου Α., 2008).

Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που την διέπουν, έδειξαν ότι υπάρχουν στάδια, τα οποία μπορούν να προληφθούν. Σήμερα η χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου, ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et al, 2004, Surch, 2003) Η στρατηγική χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο: την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνισή του (primary prevention) και την έγκαιρη ανίχνευση, αναστροφή και περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et al., 2001, Smith et al., 2005). Η παρεμπόδιση της καρκινογένεσης μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους: α) με τη μείωση της έκθεσης σε καρκινογόνα στα πλαίσια της αλλαγής του τρόπου διαβίωσης, β) με την έγκαιρη διάγνωση των προδιαθεσικών ατόμων για την εμφάνιση καρκίνου και τη διενέργεια κλινικών εξετάσεων παρακολούθησής τους και γ) την χημειοπροστασία με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα. Εκ των τριών παραπάνω προσεγγίσεων πολύ σημαντική θεωρείται η τελευταία, διότι οι δύο πρώτες απαιτούν ακριβή γνώση των αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν σε καρκινογένεση ( Shureiqi et al, 2000).

### **1.2.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες**

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες διαχωρίζονται ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο επιδρούν. Γενικά οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έχουν πλειοτροπική δράση, δρώντας με ποικίλους μηχανισμούς και αλληλεπιδρώντας ποικιλοτρόπως με τους καρκινογόνους παράγοντες. Οι μηχανισμοί δράσης τους επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωσή τους, η βιοδιαθεσιμότητά τους, ο τρόπος εισαγωγής τους στον οργανισμό κ.α. (De Flora & Ferguson, 2005, Kelloff, et al, 2005).

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες (Wattenberg LW., 1985):

- i. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
- ii. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου. Αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης.
- iii. Παράγοντες παρεμπόδισης ή καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Αναστέλλουν την προαγωγή και την πρόοδο της καρκινογένεσης.

#### i. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.

Εδώ περιλαμβάνονται παράγοντες που έχουν προστατευτική δράση πριν την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Γενικά αναστέλλουν τον σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι φυτικές πολυφαινόλες (ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, λουτεολίνη κ.α.), τα αναγωγικά οξέα (π.χ. ασκορβικό οξύ), διάφορα αμινοξέα και σουλφυδρυλικές ενώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) που ελαττώνει το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και οδηγεί σε ελάττωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (Mirvish 1981, Hartman και Shankel 1990, Κουρέτας 2003).

#### ii. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου.

Στους παράγοντες που παρεμποδίζουν την δράση του καρκινογόνου δρώντας στην πρώτη φάση της καρκινογένεσης περιλαμβάνονται οι:

1) *Αναστολείς του κυτοχρώματος P450.* Τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών, όπου κυρίαρχο ρόλο έχουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, μπορεί να μετατρέπουν προ-καρκινογόνα σε καρκινογόνα. Ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων του P450 θεωρούνται ότι μπορεί να παρεμποδίζουν την καρκινογένεση.

2) *Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών.* Οι αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας και της απέκκρισης των ξενοβιοτικών ουσιών. Συνεπώς, ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II (π.χ. την τρανσφεράση της γλουταθειόνης-GST) πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην απομάκρυνση καρκινογόνων ουσιών. Για παράδειγμα, ένα ισοθειοκυανικό παράγωγο που βρίσκεται στα μπρόκολα, είναι πιθανός επαγωγέας της GST και αναστέλλει τη χημικά προκαλούμενη ανάπτυξη των όγκων σε αρουραίους (Zhang et al., 1992).

3) *Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών.* Τα περισσότερα καρκινογόνα μεταβολίζονται σε δραστικές ηλεκτρονιόφιλες μορφές που



αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικές ενώσεις με αποτέλεσμα την δημιουργία μεταλλάξεων. Συνεπώς η εξουδετέρωσή τους αποτελεί βασικό μηχανισμό χημειοπροφυλακτικής δράσης.

4) *Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA.* Είναι ένζυμα ή φυσικές ουσίες που είτε άμεσα είτε έμμεσα εμπλέκονται στους μηχανισμούς αποκατάστασης βλαβών του DNA.

### iii. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.

Στους παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης κατά τους Morse και Stoner ανήκουν οι:

1) *Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών.* Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η νεοπλασματική εξαλλαγή σχετίζεται με τη συγκέντρωση των πολυαμινών που συχνά είναι αυξημένη στους καρκινικούς ιστούς. Υπάρχουν παράγοντες που εμφανίζουν ανασταλτική δράση ως προς το μεταβολισμό των πολυαμινών.

2) *Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης.* Χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι η μη διαφοροποίησή τους. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Α και το ρετινοϊκό οξύ, προκαλούν διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την αναστολή της καρκινογένεσης (Huang et al, 1986, Sani et al, 1990).

3) *Ρυθμιστές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος.* Τα ενδιάμεσα των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μπορεί να αποτελέσουν στόχους χημειοπροφύλαξης με σκοπό την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα φλαβονοειδή που αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C συμβάλλοντας έτσι σε καταστολή της καρκινογένεσης. (Kelloff GJ, et al, 1997).

4) *Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων.* Εδώ μπορεί να έχουμε μια πιο άμεση αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καρκινογένεσης μέσω της ρύθμισης της δραστηρότητας ορμονών και αυξητικών παραγόντων που γίνεται επεμβαίνοντας στους υποδοχείς τους στην κυτταροπλασματική και την πυρηνική μεμβράνη. Σχετικό παράδειγμα είναι τα αντι-

οιστρογόνα (π.χ. ταμοξιφαίνη) που συνδέονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς των οιστρογόνων αναστέλλοντας έτσι την σύνδεση και προαγωγική δράση των οιστρογόνων σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Jordan VC, 1992).

5) *Αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων.* Μεγάλο κομμάτι της έρευνας σχετικά με την ανασταλτική δράση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων έναντι των ογκογονιδίων έχει εστιαστεί στο ογκογονίδιο *ras*, η ενεργοποίηση του οποίου προϋποθέτει τη φαρνεσυλίωσή του. Η ουσία D-λιμονίνη που υπάρχει στα κίτρα, αναστέλλει την πρόοδο των όγκων του μαστού αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά καρκινογόνα.(Elson et al, 1998).

6) *Επαγωγείς της διακυτταρικής επικοινωνίας.* Οι χασμοσύνδεσμοι είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων που συμβάλλουν στην επικοινωνία μεταξύ τους. Αυτή η επικοινωνία αναστέλλεται στους όγκους. Ουσίες όπως το ρετινοϊκό οξύ, η βιταμίνη Α και το β-καροτένιο που προάγουν την διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση.(Zhang et al, 1991, Κουρέτας Δ, 2003).

7) *Επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης.* Υπάρχουν χημειοπροστατευτικοί παράγοντες που έχουν επαγωγικές δράσεις της ανοσολογικής απόκρισης. Σχετικά παραδείγματα είναι η βιταμίνη Ε που σε κάποιες δόσεις αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων και το ρετινοϊκό οξύ που συμβάλλει στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killers-NK).(Hill DL, Grubbs CJ. 1992).

8) *Επαγωγείς της απόπτωσης* Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών.(Νακοπούλου Α, Μιχαλοπούλου Α., 1997). Διαταραχή αυτής της ομοιόστασης μπορεί να έχει σοβαρές παρενέργειες όπως η καρκινογένεση. Παράδειγμα επαγωγέα της απόπτωσης είναι το τριοξειδίο του αρσενικού που επάγει την απόπτωση στα λευχαιμικά κύτταρα. Αυτό ενεργεί άμεσα επί της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου εξαλείφοντας το δυναμικό αυτής και οδηγώντας στην αναστολή της έκφρασης του Bcl-2 και την αύξηση της έκφρασης της κασπάσης-3. Χορηγείται για την αντιμετώπιση της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας.(Zhu J et al., 2002).

9) *Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA*. Η υπομεθυλίωση του DNA προκαλεί αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν ως δότες μεθυλομάδων.

10) *Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης*. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και ένζυμα που συντελούν στη λύση της βασικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεάσες (ελαστάση, κολλαγενάση, υαλουρονιδάση) και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η χημειοπροστατευτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών σε κάποιο ποσοστό οφείλεται στην αναστολή λύσης της βασικής μεμβράνης. (Kennedy AR., 1998).

11) *Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος*. Ανάμεσα στα άλλα που λαμβάνουν χώρα κατά τη φάση προαγωγής της καρκινογένεσης συμβαίνει και αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος που συμμετέχει στην φλεγμονώδη αντίδραση. Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα (Κουρέτας Δ, 2003). Κατά τη διάρκεια των παραπάνω διεργασιών παράγονται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με μελέτες αναστολείς των κυκλοοξυγενασών (αντιφλεγμονώδη φάρμακα και φυτικές πολυφαινόλες) δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση. (Reddy BS et al, 1987). Επιπροσθέτως αναστολείς της λιποξυγενάσης (π.χ. βιταμίνη E) αναστέλλουν την φάση προαγωγής της καρκινογένεσης στην επιδερμίδα ποντικών. (Huang MT et al, 1991).

### **1.3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ**

#### **1.3.1. Γενικά**

Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις είναι ουσίες φυτικής προέλευσης που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες ( Σπανού X, 2010). Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες συνιστούν μία από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο

διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί κ.α. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν. (Kris- Etherton, PM, et al 2002). Γενικά στις πολυφαινόλες οφείλεται το χρώμα και γευστικά χαρακτηριστικά των οίνων (στυφάδα, τραχύτητα) και το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες εξαιτίας κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία.(Dew T.P, et al 2005).

### **1.3.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών**

Οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μιας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στη φύση απαντώνται επί το πλείστον με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή, με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Σχετικά με τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια αφού άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Ταξινομούνται σε κατηγορίες με βάση τη χημική δομή τους, δηλαδή αναλόγως του αριθμού των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Έτσι οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή.

#### **1.3.2.1. Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο συνήθη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών. Περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα στα φυτά και η λίστα αυξάνεται σταθερά.( Cheynier, 2005). Η χαρακτηριστική δομή των φλαβονοειδών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο, έχουν δηλαδή τη δομή (C6-C3-C6). Τα φλαβονοειδή που απαντώνται στη

διατροφή διαφέρουν στην κατανομή των υδροξυλομάδων, των μεθοξυομάδων, των γλυκοζιτικών πλευρικών ομάδων και στη σύζευξη των Α και Β δακτυλίων.

Διακρίνονται σε 6 κατηγορίες, τις:

Φλαβονόλες: αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα φλαβονοειδή των τροφίμων. Βρίσκονται στις περισσότερες τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο με σημαντικότερες πηγές τους να είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι.(Manach C, et al, 2004). Οι φλαβονόλες συνήθως βρίσκονται με τη γλυκοσιλιωμένη τους μορφή με τα συζευγμένα σάκχαρα να είναι κυρίως η γλυκόζη και η ραμνόζη. Κυριότερες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη και η καμπερόλη.

Φλαβόνες: βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, το μαϊντανό, στα δημητριακά (σε γλυκοσιλιωμένη μορφή κυρίως) και στα εσπεριδοειδή ( σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) ( Shahidi F, Naczk M. 1995). Υπάρχουν κυρίως ως 7-Ο-γλυκοσίδια με κυριότερους εκπροσώπους τη λουτεολίνη και την απιγενίνη.

Ισοφλαβόνες: χαρακτηριστικό των ισοφλαβονών είναι οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', μια δομή που προσδίδει στις ισοφλαβόνες ιδιότητα φυτο-οιστρογόνου και την ικανότητα να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων. Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και ιδιαίτερα την σόγια η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντανζεΐνης και γενιστεΐνης. ( Manach C. et al, 2004).

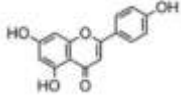
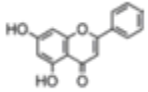
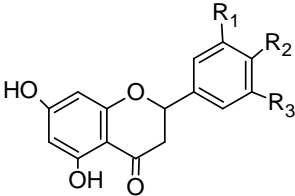
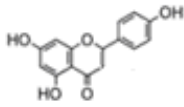
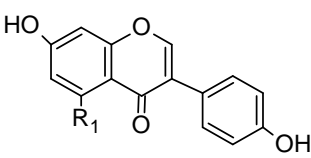
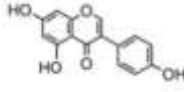
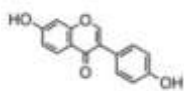
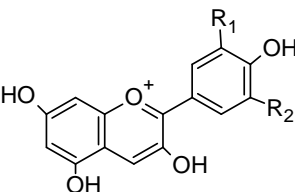
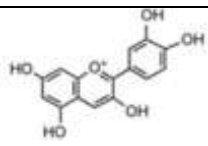
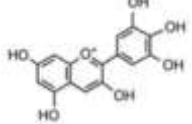
Φλαβανόνες: βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά (μέντα) και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή. (Tomas-Barberan FA, Clifford MN. 2000). Κυριότερες φλαβανόνες αποτελούν η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριοντικτιόλη. Η χημική τους δομή επιτρέπει τη σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες.( Manach C. et al, 2004).

Ανθοκυανιδίνες: βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (λάχανο, φασόλια, μελιτζάνα κ.α.) και ιδιαιτέρως στα φρούτα.(Clifford MN. 2000). Εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και προσδίδουν το ροζ, κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα. Κύρια εκπρόσωπος είναι η κυανιδίνη. ( Manach C. et al, 2004).

Φλαβανόλες: συνιστούν την πιο πολύπλοκη ομάδα των φλαβονοειδών, Υπάρχουν είτε ως μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη) είτε ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Οι προανθοκυανιδίνες, που ονομάζονται και συμπυκνωμένες τανίνες, υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες έπειτα από κατεργασία με ισχυρά οξέα. (Crozier A, et al. 2006). Εντοπίζονται σε πολλά φρούτα, στο κόκκινο κρασί, αλλά σημαντικότερες πηγές τους είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα.

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση και χημικές δομές των φλαβονοειδών.

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή $R_{1,2,3}$ : -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή	
Φλαβονόλες		κερκετίνη	
		καμπφερόλη	
		μυρικετίνη	
Φλαβανόλες		(+)-κατεχίνη	
		(-)-επικατεχίνη	
		επιγαλλοκατεχίνη	
Φλαβόνες		λουτεολίνη	

		απιγενίνη	
		χρυσίνη	
Φλαβανόνες		ναριγενίνη	
Ισοφλαβόνες		γενιστεΐνη	
		ντανζεΐνη	
Ανθοκυανιδίνες		κυανιδίνη	
		δελφινιδίνη	

### 1.3.2.2. Μη Φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε τρεις κύριες κατηγορίες, τα:

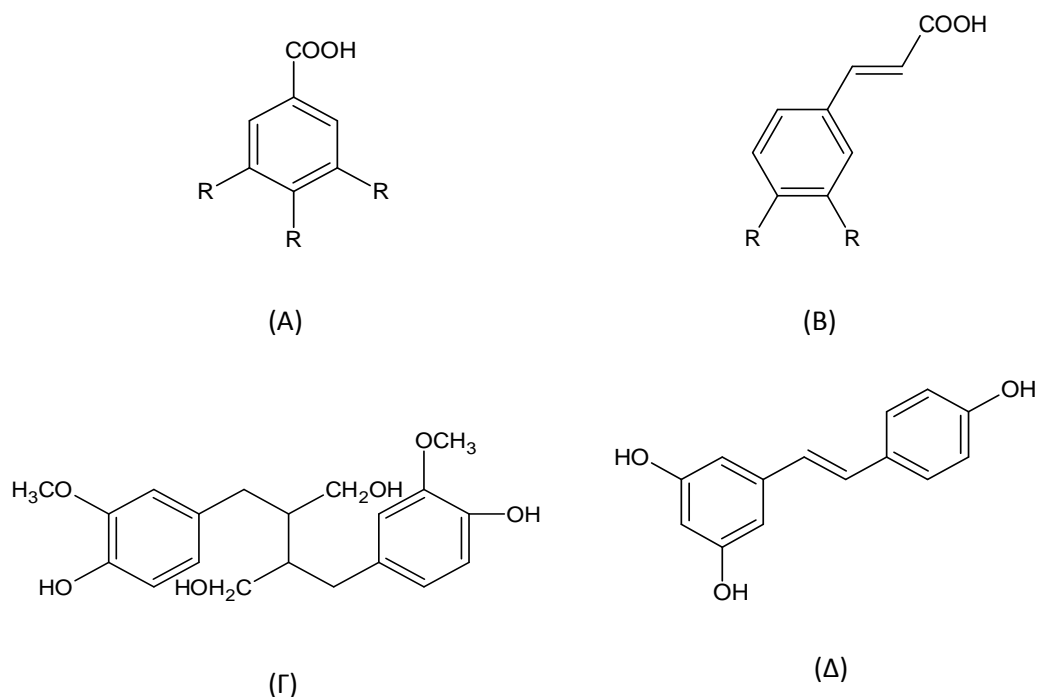
Φαινολικά οξέα: μπορούμε να τα διακρίνουμε στα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκινναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξαιρέση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολύμενες τανίνες (Clifford MN, Scalbert A. 2000). Χαρακτηριστικότερα βενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ.

Τα υδροξυκινναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά. Συνήθως γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουνικό, το σικιμικό και το ταρταρικό οξύ. Κυριότερα μέλη είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ. Είναι γνωστή η δράση του καφεϊκού οξέος τόσο στην απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων όσο και στη δραστηριότητα της κασπάσης 3 από πολλές μελέτες. (Lee HJ, et al. 2005).

Λιγνάνια: σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, είναι συνήθως συνδεδεμένες με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Μεταβολίζονται στο παχύ έντερο σε διάφορες ουσίες που δρουν ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ μικροποσότητες περιέχονται σε δημητριακά, φρούτα και λαχανικά. (Adlercreutz H, Mazur W.1997).

Στιλβένια: αποτελούν μικρό ποσοστό των πολυφαινόλων που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα μεθυλενίου και απαντάται κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί. (Bertelli A, et al. 1998). Έχει μελετηθεί εκτενώς εξαιτίας της πιθανής αντικαρκινικής της δράσης.





**Εικόνα 3:** Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών. (Α) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Β) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοϊσολαρισιρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.

### 1.3.3. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών

Στις πολυφαινόλες αποδίδονται ποικίλες βιολογικές δράσεις που άπτονται τόσο του ίδιου του φυτού παραγωγού, όσο και του ανθρώπου καταναλωτή. Έτσι οι πολυφαινόλες:

- Θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. (Manach C, et al, 2004). Συμβάλλουν έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων. Σύμφωνα με μελέτες συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας, των περιβαλλοντικών πιέσεων και της προσβολής από παθογόνα. Επίσης λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων. Τέλος συμμετέχουν στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του φυλοκαθορισμού και της φωτοσύνθεσης. ( Manach C, et al, 2004, Di Carlo G, et al., 1999, Harborne JB. 1986).

➤ Συνιστούν τα καλύτερα αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής και συνεισφέρουν στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Έτσι συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες όπως είναι οι καρδιαγγειακές ασθένειες, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος ( Scalbert A, et al, 2005). Δεσμεύοντας οι πολυφαινόλες τις ελεύθερες ρίζες τις εμποδίζουν να προκαλέσουν υπεροξείδωση της LDL (Low Density Lipoprotein) που συμβάλλει στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων, βλαβών και μεταλλάξεων στο DNA που συνιστούν σημαντικά βήματα για την έναρξη της καρκινογένεσης. Οι διατροφικές πολυφαινόλες συγκεντρώνουν μεγάλο ενδιαφέρον και λόγω της ικανότητάς τους να ενεργούν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έναντι της καρκινογένεσης. Η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινολών, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων. (Bode A.M. & Dong Z, 2006). Οι πολυφαινόλες *in vivo* έχουν πλειοτροπική δράση που σχετίζεται με πολλούς παράγοντες. Ωστόσο, κάποιοι μηχανισμοί δράσης τους που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με: την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και τον ρυθμιστικό ρόλο που έχουν στην διαδικασία της απόπτωσης και την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Επιπλέον πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποστηρίζουν τον ρόλο των πολυφαινολών στην πρόληψη νευροεκφυλιστικών ασθενειών και της οστεοπόρωσης. ( Scalbert A. et al, 2005).

## **1.4. ΧΕΙΛΑΝΘΗ**

### **1.4.1. Η οικογένεια των χειλανθών [Lamiaceae ή Labiatae]**

Η οικογένεια των χειλανθών εμφανίζει μια κοσμοπολίτικη κατανομή με κυριότερη παρουσία στη Μεσογειακή ζώνη. Περιλαμβάνει περίπου 236 γένη και 7.200 είδη (Raymond M. Harley et al, 2004). Σε αυτήν ανήκουν κυρίως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, βότανα, θάμνοι και σπανιότερα δέντρα σημαντικότερα των οποίων είναι το φασκόμηλο (*Salvia*), το θυμάρι (*Thymus*), η μέντα (*Mentha*), η

ρίγανη (*Origanum*), το δεντρολίβανο (*Rosmarinus*), η λεβάντα (*Lavandula*), ο βασιλικός (*Ocimum*) και το τσάι του βουνού (*Sideritis*) (Kokkini S. et al, 2004).

Πολλά μέλη αυτής της οικογένειας είναι αρωματικά και εκκρίνουν αιθέρια έλαια από τους αδένες των φύλλων και των βλαστών με πολλές ωφέλιμες χρήσεις για τον άνθρωπο. Το συνολικό περιεχόμενο σε αιθέρια έλαια ποικίλλει σημαντικά τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά ανάλογα με το είδος, την εποχή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο χρόνος συγκομιδής θεωρείται σημαντικός τόσο όσον αφορά το συνολικό περιεχόμενο σε αιθέρια έλαια όσο και στην αναλογία βιοδραστικών συστατικών. Σχετικό παράδειγμα αποτελεί το φασκόμηλο που περιέχει τη διπλάσια ποσότητα σε αιθέρια έλαια στο τέλος του καλοκαιριού σε σχέση με την αρχή της άνοιξης και επίσης διαφέρει στα φαινολικά συστατικά (Kokkini S. et al, 2004). Πολλά μέλη αυτής της οικογένειας είναι ευρέως καλλιεργήσιμα για τις αρωματικές τους ιδιότητες αλλά και για την ευκολία της καλλιέργειάς τους, αφού μπορούν να αναγεννηθούν με κυτταροκαλλιέργειες βλαστοκυττάρων. Επιπλέον καλλιεργούνται για διακοσμητικούς σκοπούς, για λόγους μαγειρικής και εξαιτίας των εδωδιμων φύλλων τους. Τέλος φυτά της οικογένειας των χειλανθών παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις όπως αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αγχολυτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινογόνες συμβάλλοντας έτσι στη θεραπεία πολλών ασθενειών.

#### **1.4.2. Φασκόμηλο (*Salvia spp.*)**

##### **1.4.2.1. Βοτανικά στοιχεία**

Το φασκόμηλο ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (*Lamiaceae*), στην τάξη των Λαμιοδών (*Lamiales*) στην ομοταξία των δικοτυλήδων και στη συνομοταξία των αγγειοσπέρμων. Είναι δικότυλοι, πολυετείς, αειθαλείς θάμνοι. Έχουν γκριζοπράσινα μαλακά φύλλα και μωβ-μπλε λουλούδια στα άνθη κατά το καλοκαίρι. Φύονται σε ηλιόλουστες περιοχές με αλκαλικά εδάφη και εγγίζουν το 1-1.5 μέτρο ύψος. Το φασκόμηλο αποτελεί το μεγαλύτερο γένος των χειλανθών με περίπου 700-900 είδη από θάμνους, πόες και μονοετή φυτά. (Sutton John 2004, Clebsch Betsy, Carol D. Barner 2003). Τα πιο γνωστά είδη είναι τα *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia sclarea*, *Salvia viridis*, *Salvia horminoides*, *Salvia divinorum*, *Salvia rutilans* και *Salvia pomifera*. Στην Ελλάδα συναντούμε 23 είδη φασκόμηλου με κοινές ονομασίες όπως ελελίφασκος, αλιφασκιά, φασκομηλιά, μηλοσφακιά, και αγριοφασκιά.

Το πιο γνωστό είδος είναι το *Salvia officinalis* που καλλιεργείται στην πρώην Γιουγκοσλαβία, στην Αλβανία, στην Τουρκία, στην Ιταλία, στην Ελλάδα, στις ΗΠΑ και στην Ισπανία ( Skoula et al, 2000). Στην χώρα μας ως αυτοφυές συναντάται στην περιοχή της Ηπείρου..

Το *Salvia fruticosa*, γνωστό στην Ελλάδα και ως αλιφασκιά, είναι ενδημικό των μεσογειακών και μεσανατολικών χωρών και αποτελεί το πιο κοινό είδος *Salvia* στην Ελλάδα. Συνήθως φύεται σε υψόμετρο κάτω των 300 μέτρων.

Το *Salvia sclarea* προέρχεται από την λατινική λέξη *sclarea* (καθαρός-φωτεινός) και σχετίζεται με την παραδοσιακή χρήση του φυτού για τον καθαρισμό των ματιών. Καλλιεργείται στις εύκρατες περιοχές του πλανήτη. Κυριότερα κέντρα παραγωγής είναι η Γαλλία, η πρώην Σοβιετική Ένωση και η Ουγγαρία ( Simon JE, et al, 1984). Στην Ελλάδα ως αυτοφυές συναντάται στην Ήπειρο και τη Μακεδονία σε υψόμετρο 300-900 μέτρων (Simon JE, 1984, Λάζαρη Δ, 2005).



**Εικόνα 4 :** *salvia sclarea*

#### **1.4.2.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία**

Τα διάφορα είδη *Salvia* έχουν χρησιμοποιηθεί από αρχαίων χρόνων λόγω των ποικίλων ευεργετικών ιδιοτήτων που έχουν. Κατά τον μεσαίωνα χρησιμοποιούνταν εκτενώς για προβλήματα υγείας. Διάφορα είδη *Salvia* έχουν χρησιμοποιηθεί στην λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία πληγών και την ανακούφιση του στομάχου και του ήπατος καθώς και την αντιμετώπιση ρευματισμών και του κοινού κρυολογήματος με

τη μορφή έγχυσης και αφεψήματος σε διάφορα μέρη του κόσμου (Bayrak A, & Akgul A. 1987, Sezik E. & Yesilada E. 1999). Οι γλοιώδεις σπόροι τους χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό και τη μείωση της φλεγμονής των οφθαλμών ενώ έχουν αναφερθεί και αντισπασμωδικές, αιμοστατικές και αντικαρκινογόνες ιδιότητές τους ( Simon JE, et al, 1984). Συστατικά των φυτών αυτών έχουν επιδείξει αντιμικροβιακή δράση, αντιοξειδωτική δράση και αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Hohmann J, et al 1999, Pizzale L, et al 2002, Masaki H, et al 1995). Εκχυλίσματα τους έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση λίπους και τροφίμων που περιέχουν λίπος (Schwarz K, Ternes W. 1992). Φρέσκα και αποξηραμένα φύλλα φασκόμηλου χρησιμοποιήθηκαν ως προσθετικά γεύσης και ως υποκατάστατο λυκίσκου, τα άνθη του σε τσάι και οινοπνευματώδη ποτά και τα αιθέρια έλαιά του ως αρωματικό στη βιομηχανία αρωμάτων. Το εκχύλισμα του φασκόμηλου συχνά αναμιγνύεται με λεβάντα, γιασεμί ή άλλα αρωματικά και χρησιμοποιείται σε σαπούνια, απορρυπαντικά, κρέμες, σκόνες, αρώματα και λοσιόν ( Simon JE, et al, 1984).

Όλες οι παραπάνω ιδιότητες του φασκόμηλου οφείλονται στις βιοδραστικές ουσίες που περιέχει και κυρίως τις πολυφαινολικές ενώσεις και τα τερπένια. Για παράδειγμα η αντιοξειδωτική δράση του οφείλεται στα τερπενοειδή και τα φαινολικά οξέα όπως ενεργά ολιγομερή του καφεϊκού οξέος (σαλβιανολικά οξέα) ( Yinrong Lu and L. Year Foo, 1999). Η αντιφλεγμονώδης δράση του οφείλεται στα τριτερπένια (ολεανολικό και ουρσολικό) και το διτερπένιο καρνοσολικό οξύ ( Baricevic D, et al, 2001) και η αντιμικροβιακή δράση του αποδόθηκε στην παρουσία 1,8 κινεόλης, θυγιόνης και καμφοράς ( Jalsenjak V, et al 1987, Sur SV, et al 1991).

#### *Πολυφαινολικές ενώσεις*

Τα διάφορα είδη του φασκόμηλου περιέχουν πληθώρα πολυφαινολικών ενώσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 160, μεγάλος αριθμός των οποίων προέρχονται από χημικές μετατροπές του καφεϊκού οξέος.

#### *Φλαβονοειδή*

Τα φλαβονοειδή είναι πολύ κοινά στο γένος *Salvia* και ιδιαίτερος οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες (κυρίως γλυκοσίδες φλαβονολών).

## Φαινολικά οξέα

Ο αριθμός των φαινολικών οξέων που βρέθηκαν σε διάφορα είδη *Salvia* είναι πράγματι μεγάλος. Ενδεικτικά μπορούμε να αναφέρουμε τα ακόλουθα: καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, cis-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύν-)-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο, trans-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύν-)-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο, σαλβιανολικό οξύ I, σαλβιανολικό οξύ K, σαζεκουμαρίνη, φερουλικό οξύ (Κουλάδη Μ, 2005)

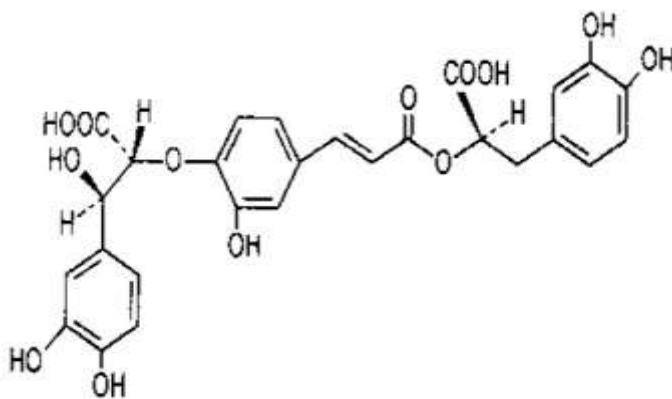
### 1.4.2.3. Καθαρά μόρια *Salvia sclarea*

Τα καθαρά μόρια από εκχύλισμα του φυτού *Salvia sclarea* που μελετήθηκε η δράση τους είναι τα:

#### ➔ Salvianolic acid K (σαλβιανολικό οξύ K)

Ανήκει στα μη φλαβονοειδή φαινολικά οξέα και ονομάζεται και φαινυλοπροπανοϊδικό οξύ. Είναι ουσία διαλυτή στο νερό και σε μεθανολικούς διαλύτες και έχει μοριακό βάρος-MW=364.18. Στην παρούσα εργασία αναφέρεται με τον κωδικό Ess1.

Σύμφωνα με μελέτες έχει ευεργετική επίδραση ως προς την ηπατική λιπιδική υπεροξείδωση, τις ηπατικές βλάβες και την ίνωση. Επίσης βελτιώνει την περιφερειακή αιμάτωση του εγκεφάλου σε ισχαιμικές καταστάσεις και αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. (Tang MK, et al, 2002).



**Εικόνα 5 :** χημική δομή salvianolic acid K

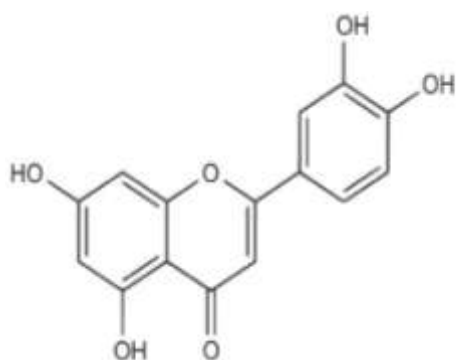
### ➔ Luteolin 3-O-glucuronide (3-O-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης)

Ανήκει στις γλυκοσίδες των φλαβονών. Διαλύεται σε μεθανολικούς διαλύτες και έχει μοριακό βάρος-MW=462.07. Στην παρούσα εργασία αναφέρεται με τον κωδικό Ess3.

Η luteolin 3-O-glucuronide έχει όπως οι περισσότερες γλυκοσίδες των φλαβονών αντιοξειδωτικές ιδιότητες και προστατευτική δράση έναντι βλαβών πολλών ιστών. Επίσης σχετίζεται με την εξουδετέρωση ενώσεων ενεργού οξυγόνου, την αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και την καταστολή της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο.

### ➔ Luteolin (λουτεολίνη)

Ανήκει στις φλαβόνες, είναι διαλυτή σε μεθανολικούς διαλύτες και έχει μοριακό βάρος-MW=283.24. Αναφέρεται με τον κωδικό Ess8. Συνιστά συνήθη φλαβόνη και συναντάται στο σέλερυ, το πράσινο πιπέρι, το θυμάρι, το χαμομήλι, τα καρότα, το ελαιόλαδο, τη μέντα, το δενδρολίβανο, τα πορτοκάλια μέρλιν και τη ρίγανη ( Kayoko S, et al 1998, Lopez-Lazaro M. 2009). Ως επί το πλείστον εντοπίζεται στα φύλλα. Της αποδίδονται ποικίλες ιδιότητες όπως αντι-οξειδωτική δράση, δέσμευση των ελευθέρων ριζών, προαγωγή του μεταβολισμού των υδρογονανθράκων και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι παραπάνω ιδιότητες υποδεικνύουν μια πιθανή χημειοπροστατευτική δράση. Σύμφωνα με μετρήσεις η λουτεολίνη είναι αποτελεσματικότερη της βιταμίνης C και άλλων φλαβονοειδών στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης του DNA ( Gebhardt R, 1996). Επίσης σε in vitro πειράματα προλαμβάνει την οξείδωση της LDL-χοληστερόλης και έτσι πιθανόν να μειώνει την πιθανότητα αθηροσκλήρωσης (Brown JE, 1998). Αποτελέσματα ερευνών αποδίδουν στην λουτεολίνη αντιφλεγμονώδη δράση (Johnson et al, 2008), ενώ in vitro μελέτες δείχνουν επίδραση και στη σκλήρυνση κατά πλάκας ( Theoharides, 2009). Τέλος δρα ως ενεργοποιητής του μεταφορέα μονοαμινών και αποτελεί ένα από τα ελάχιστα χημικά που έχουν αυτή την ιδιότητα ( Zhao G, et al 2010).



**Εικόνα 6:** χημική δομή λουτεολίνης

### 1.4.3. Μέντα (*Mentha spp.*)

#### 1.4.3.1. Βοτανικά στοιχεία

Η μέντα ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae), στην τάξη των Λαμιοδών (Lamiales), στην ομοταξία των δικοτυλήδων και στη συνομοταξία των αγγειοσπέρμων. Το όνομά της προέρχεται από το λατινικό *menthe* που προέρχεται από το αρχαιοελληνικό μίνθη. Το γένος της μέντας έχει υποκοσμοπολίτικη κατανομή και εμφανίζεται στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία, την Αυστραλία και τη Β.Αμερική (Brickell C, et al 1997). Ο αριθμός των ειδών της μέντας δεν είναι απόλυτα σαφής και εκτιμάται από 13-18 (Bunsawat J, et al 2004). Τα φυτά αυτά είναι πολυετή με τετράγωνους βλαστούς. Φέρουν φύλλα επιμήκη, λογχοειδή με οδοντωτά άκρα διατεταγμένα σε αντίθετα ζευγάρια. Τα χρώματα των φύλλων ποικίλλουν από σκούρα πράσινα και γκριζοπράσινα σε μωβ, μπλε και μερικές φορές ανοικτό κίτρινο (Brickell C, et al 1997). Τα λουλούδια είναι λευκά-μωβ που παράγονται σε ψευδοσπονδυλώματα και οι καρποί είναι μικρές ξηρές κάψες που περιέχουν τέσσερα σπέρματα. Όλα τα είδη μέντας αναδίδουν ένα ιδιαίτερο έντονο άρωμα που οφείλεται σε ένα αιθέριο έλαιο που υπάρχει στα φύλλα και τα στελέχη και περιέχει μινθόλη (Kokkini S, 2003). Στη Ελλάδα εξαιτίας της γεωκλιματικής ποικιλομορφίας φύεται σε όλη την έκταση της χώρας. Τα κυριότερα είδη μέντας που απαντώνται στον Ελλαδικό χώρο είναι τα: *Mentha piperita* (μέντα η πιπερώδης), *Mentha viridis* (πράσινη μέντα), *Mentha pulegium* (μέντα η πουλέγιος), *Mentha longifolia* (αγριοδυόσμος), *Mentha aquatica*, *Mentha arvensis*, *Mentha microphylla*, *Mentha rotundifolia* (γλυφώνι ή καλαμίθρα).





**Εικόνα 7:** *Mentha microphylla*

#### **1.4.3.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία**

Τα διάφορα είδη μέντας έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά στην ιατρική για τις ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες τους, οι οποίες κατά κύριο λόγο οφείλονται στα μονοτερπένια που βρίσκονται ως επί το πλείστον στα αιθέρια έλαιά τους και στις διάφορες πολυφαινόλες.

Τα αιθέρια έλαια έχουν αντιμικροβιακή, αντι-ικκή και αντισπασμωδική δράση, ενώ διαλύουν και τα αέρια του στομάχου. Τελευταία διάφορα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται και ως φυσικά αντι-οξειδωτικά ενώ ερευνάται και πιθανή αντικαρκινογόνος δράση τους. Η μινθόλη θεωρείται το πιο σημαντικό συστατικό της μέντας και χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς και διατροφικούς σκοπούς. Εμφανίζει αντιμικροβιακή, τονωτική, αντισπασμωδική, αναλγητική, καρδιοτονωτική, αντιβηχική και αντι-ασθματική δράση, ηρεμιστική για το στομάχι και κατά των ιλίγγων, της ταχυκαρδίας και των νευρικών διαταραχών. (Zheng W, Wang SY. 2001).

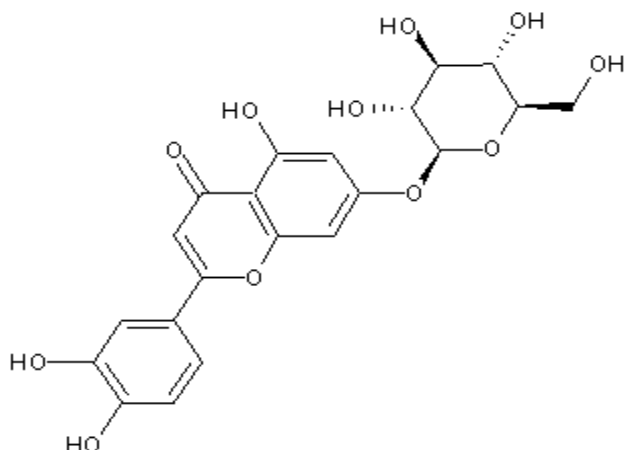
Από τις πολυφαινόλες σημαντικότερες είναι τα φλαβονοειδή με ένα ευρύ φάσμα δράσεων: αντιοξειδωτική, κυτταροπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, εναντίον του έλκους, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική, χημειοπροστατευτική κ.α. Επίσης πρέπει να αναφέρουμε πως εκτός των θεραπευτικών ιδιοτήτων έχουν αναφερθεί και αρνητικές επιπτώσεις στους ανθρώπους (π.χ. σε υψηλές συγκεντρώσεις η πουλεγόνη δρα τοξικά).

#### 1.4.3.3. Καθαρά μόρια *Mentha microphylla*

Τα καθαρά μόρια από εκχύλισμα του φυτού *Mentha microphylla* που μελετήθηκε η δράση τους είναι τα:

##### ➔ Luteolin 7-O- glucoside (7-O-γλυκοσίδιο της λουτεολίνης)

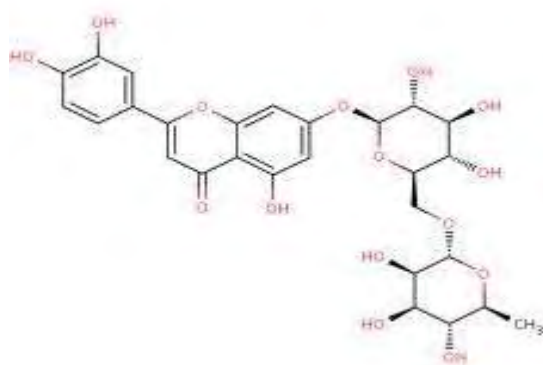
Ανήκει στις γλυκοσίδες των φλαβονών, διαλύεται σε αιθανολικούς διαλύτες και έχει μοριακό βάρος-MW=448.38. Στην παρούσα εργασία αναφέρεται με τον κωδικό Kmm1. Έχει ένα ευρύ φάσμα δράσεων ως αντιφλογιστικό, σπασμολυτικό, αναλγητικό και αντισταμινικό. Χρησιμοποιείται ως συστατικό σε αλοιφές και κρέμες για τη θεραπεία ελκών και εκζεμάτων. Ως γλυκοσίδη της λουτεολίνης έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και επίσης προλαμβάνει την οξείδωση της LDL-χοληστερόλης μειώνοντας πιθανόν τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης.



**Εικόνα 8:** χημική δομή luteolin 7-O-glucoside

##### ➔ Luteolin 7-O- rutinocide

Ανήκει στις γλυκοσίδες των φλαβονών, είναι διαλυτή σε αιθανολικούς διαλύτες και έχει μοριακό βάρος-MW=594. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται με τον κωδικό Kmm2. Και αυτή όπως και άλλα φλαβονοειδή εκδηλώνει σημαντική αντι-οξειδωτική δράση συγκρίσιμη με αυτή του L-ασκορβικού οξέος που πιθανόν να οφείλεται στη μεγάλη σταθερότητα του μορίου έναντι των ελευθέρων ριζών.



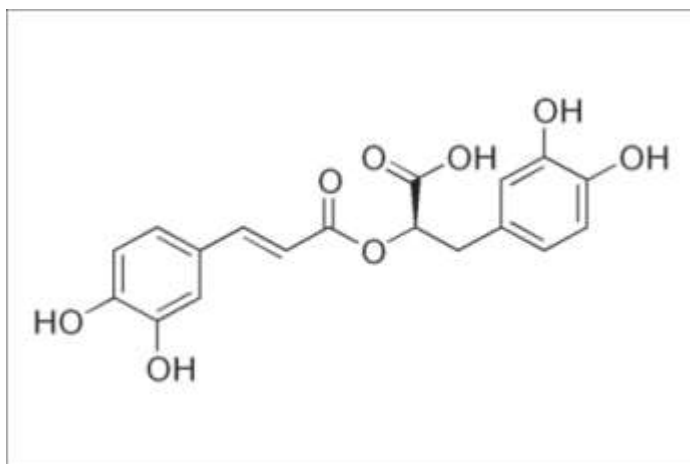
**Εικόνα 9:** χημική δομή *luteolin 7-O-rutinoside*

### ➔ **Rosmarinic acid ( ροσμαρινικό οξύ)**

Ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών καρβοξυλικών οξέων. Χημικά είναι ένας εστέρας του καφεϊκού οξέος με 3,4-διυδροξυφαινύλ-λακτικό οξύ. Είναι κόκκινο-πορτοκαλί σκόνη που είναι ελαφρώς διαλυτή στο νερό, αλλά είναι καλά διαλυτή στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Έχει μοριακό βάρος-MW=360.31. Στην παρούσα εργασία αναφέρεται με τον κωδικό Kmm4.

Απαντάται στα περισσότερα χειλανθή όπως: δενδρολίβανο, φασκόμηλο, ρίγανη, βασιλικό, μαντζουράνα, θυμάρι, μέντα, λεβάντα και στο βάλσαμο λεμονιού.

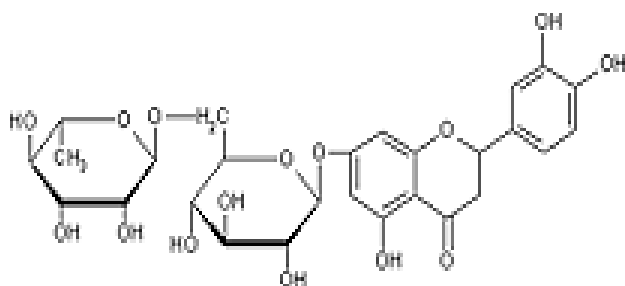
Αναφέρονται ποικίλες δράσεις του όπως αντι-οξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντι-ιική και αντιμικροβιακή. Σε εργαστηριακές μελέτες διασπά τα συσσωματώματα των β-αμυλοειδών στην ασθένεια του Alzheimer. Εμφανίζει αντι-ιική δραστηριότητα εναντίον του ερπητοϊού.( Forsch K, 2008). Η ποικιλία ισπανικού φασκόμηλου έχει ανασταλτική ιδιότητες έναντι της εστεράσης της ακετυλοχολίνης.( Perry NS, et al 2003). Επίσης πιθανή αγχολυτική της ιδιότητα στηρίζεται στη δράση της ως αναστολέα της GABA τρανσαμινάσης. Στα φυτά θεωρείται ότι λειτουργεί σαν δραστικό συστατικό της άμυνάς τους (Petersen M, 2003). Παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως πρόσθετο γεύσης φαγητών και ποτών, ως συντηρητικό των τροφών και ως καλλυντικό. Τέλος έχει χρησιμοποιηθεί για την ενδυνάμωση της μνήμης και την βελτίωση της ψυχικής διάθεσης.



**Εικόνα 10:** χημική δομή ροσμαρινικού οξέος

➔ **Eriodictyol 7-O- rutinoside (eriodictin)**

Ανήκει στις γλυκοσίδες των φλαβονών, είναι διαλυτή σε αιθανολικούς διαλύτες και έχει μοριακό βάρος-MW=596.54. Αναφέρεται με τον κωδικό Kmm5. Παρατηρείται σε 39 εσπεριδοειδή εμφανίζει όπως οι περισσότερες πολυφαινόλες αντι-οξειδωτική δράση. Επίσης βρέθηκε ότι αναστέλλει τις 5 και 12 λιποξυγενάσες σε περιτοναϊκά πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα ποντικού, καθώς και την παραγωγή του B4 λευκοτριενίου. (Nogata Y, et al, 2007).



**Εικόνα 11:** χημική δομή eriodictyol 7-O-rutinoside

## 1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού και αυτός του τραχήλου της μήτρας αποτελούν τους δύο πιο συχνούς τύπους καρκίνου μεταξύ των γυναικών. Η έρευνα πλέον στρέφεται στην πρόληψή τους λόγω των σοβαρών δυσχερειών αντιμετώπισής τους στο τελικό στάδιο. Στο πλαίσιο αυτό αναδεικνύεται ιδιαίτερος ο ρόλος των πολυφαινολικών ενώσεων ως πιθανών χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση 4 καθαρών πολυφαινολικών μορίων από τη *Mentha microphylla* και 3 από τη *Salvia sclarea* στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa (κύτταρα τραχήλου της μήτρας) και MCF-7 (κύτταρα μαστού).

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).

#### 2.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος

- i. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν κοινό και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές (HeLa και MCF-7) και είχε ως πρώτες ύλες τα εξής:
  - Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
  - 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
  - Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gibco)
  - Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά υλικά:

- Θρεπτικό υλικό με 10% FBS για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:  
250ml DMEM41966  
25mlFBS  
2.5ml pen/str  
2.5ml Γλουταμίνη
- Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών αραιώσεων των πολυφαινολικών μορίων που περιείχε:
  - 250ml DMEM41966
  - 2.5ml pen/str
  - 2.5ml Γλουταμίνη
- ii. Τρυψίνη 0.25% (Gibco)
- iii. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco).
- iv. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)
- v. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma)
- vi. Καθαρά πολυφαινολικά μόρια από *Salvia sclarea* και *Mentha microphylla*

**Πίνακας 2:** φυτικές πολυφαινόλες από *Salvia sclarea* και *Mentha microphylla*.

Κωδικός μορίου	Χημική ονομασία	MW (μοριακό βάρος)
Ess1	Salvianolic acid K	364.18
Ess3	Luteolin 3-O-glucuronide	462.07
Ess8	Luteolin	283.24
Kmm1	Luteolin 7-O-glucoside	448.38

<b>Kmm2</b>	Luteolin 7-O-rutinoside	594
<b>Kmm4</b>	Rosmarinic acid	360.31
<b>Kmm5</b>	Eriodictyol 7-O-rutinoside	596.54

## 2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1. Καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7.

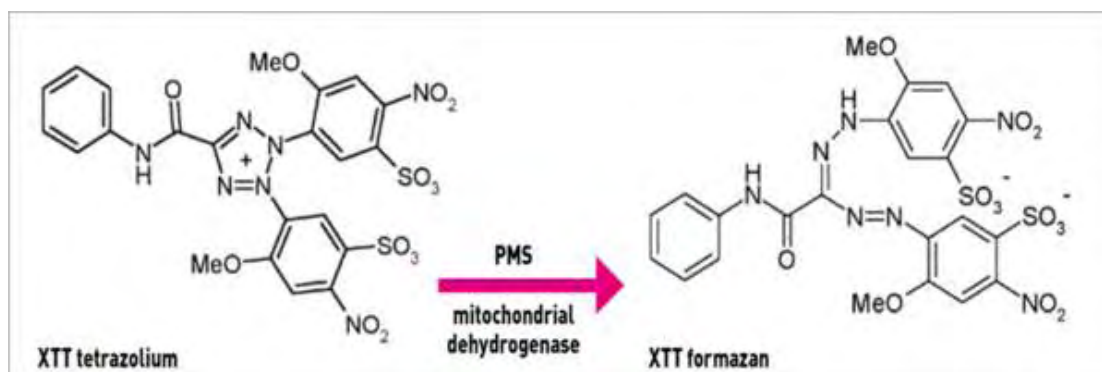
Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα των κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml) σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 330μl τρυψίνης 0.25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 4 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και εν συνεχεία επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5ml) με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminair air flow).

### 2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT

#### 2.2.2.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των καθαρών πολυφαινολικών μορίων Salvianolic acid K, Luteolin 3'-O-glucuronide, Luteolin, 7-O-luteolin glucoside, 7-O-luteolin rutinoside, Rosmarinic acid και 7-O-eriodictyol rutinoside στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7 χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Αυτό αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμετνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές

δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμεωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



**Εικόνα 12 :** μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

#### 2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναϊώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 3000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» (well plate) με 96 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις των φυτικών πολυφαινολών σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τις εξεταζόμενες ουσίες) συνολικού όγκου 100 μl. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 72 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτουμε 50 μl από το μείγμα XTT/reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. (Το μείγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B). Η προετοιμασία του μείγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, που περιείχαν μόνο κύτταρα. Λόγω της διάλυσης μερικών πολυφαινολικών μορίων σε διάλυμα DMSO 4%, οι αρνητικοί μάρτυρες για αυτές τις



πολυφαινόλες περιείχαν DMSO σε συγκέντρωση 4%. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μάρτυρες που περιείχαν τις εξεταζόμενες ενώσεις και XTT/reagent ώστε να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των μορίων επηρεάζει την απορρόφηση. Μετά την επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και την χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων (HeLa και MCF-7) υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

### 2.2.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετήθηκε η επίδραση 7 καθαρών πολυφαινολικών μορίων, που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα των φυτών *Salvia sclarea* και *Mentha microphylla*, στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7. Οι πολυφαινόλες ήταν αρχικά σε στερεή μορφή (σκόνη) και διαλύθηκαν είτε σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O, είτε σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O με την προσθήκη DMSO (4%), αναλόγως του μοριακού τους βάρους και της αρχικής τους ποσότητας. Η μελέτη της επίδρασης των μορίων στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με το XTT assay. Η χρονική διάρκεια της επώασης των πολυφαινολών στις κυτταρικές σειρές ήταν σε κάθε περίπτωση 72 ώρες. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι όταν αυξάνεται η δόση των πολυφαινολικών μορίων, παρατηρείται αύξηση και της αναστολής στην αύξηση των κυττάρων. Οι τιμές IC<sub>50</sub> (τιμές στις οποίες πεθαίνουν το 50% των κυττάρων) είναι ενδεικτικές της ικανότητας αναστολής ενός εκάστου πολυφαινολικού μορίου. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα αναστολής της κυτταρικής αύξησης.

Πιο συγκεκριμένα:

Στα HeLa κύτταρα μελετήθηκε η επίδραση των κάτωθι πολυφαινολικών μορίων:

Salvianolic acid K/Ess1 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 1, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από περίπου 1% έως 75%.  $\text{IC}_{50}=87 \mu\text{M}$ .

Luteolin 3-O-glucuronide/Ess3 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 20% έως 54%.  $\text{IC}_{50}=177 \mu\text{M}$ .

Luteolin/Ess8 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 22% μέχρι πλήρη αναστολή.  $\text{IC}_{50}=29 \mu\text{M}$ .

Luteolin 7-O- glucoside/Kmm1 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 12% έως 70%.  $\text{IC}_{50}=148 \mu\text{M}$ .

Luteolin 7-O- rutinoideside/Kmm2 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 9% έως 83%.  $\text{IC}_{50}=130 \mu\text{M}$ .

Rosmarinic acid/Kmm4 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 3% έως σχεδόν πλήρη αναστολή.  $\text{IC}_{50}=33 \mu\text{M}$ .

Eriodictyol 7-O- rutinoideside/Kmm5 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 20% έως 92%.  $\text{IC}_{50}=40 \mu\text{M}$ .

Και στα MCF-7 κύτταρα μελετήθηκαν τα ίδια μόρια με τα εξής αποτελέσματα:

Salvianolic acid K/Ess1 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 5, 10 και 50  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από περίπου 12% έως 73%.  $\text{IC}_{50}=27.5 \mu\text{M}$ .

Luteolin 3-O-glucuronide/Ess3 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 26% έως 63%.  $\text{IC}_{50}=148 \mu\text{M}$ .

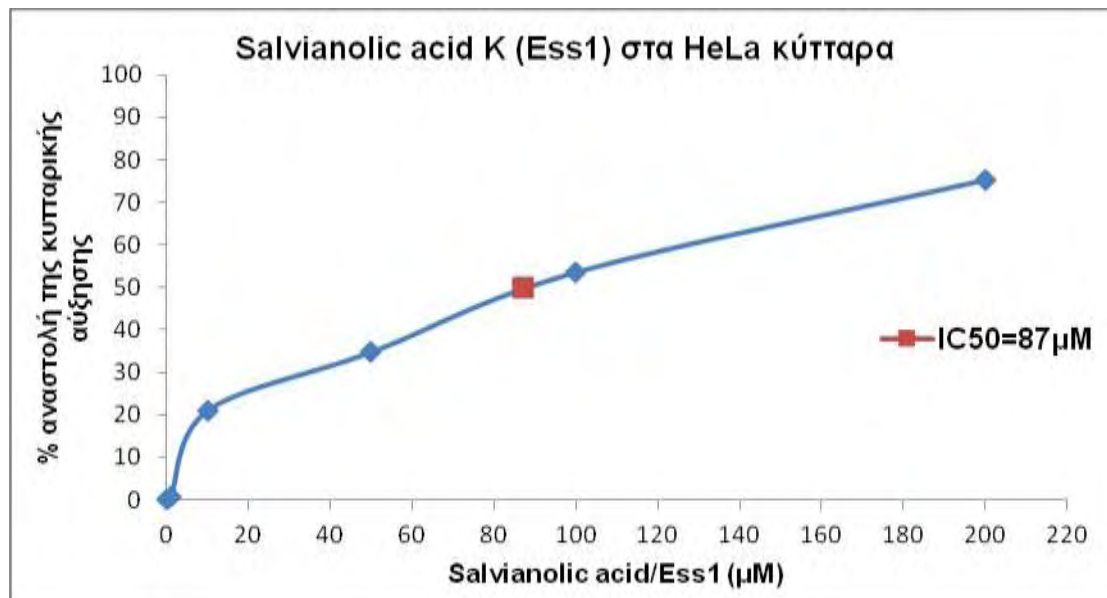
Luteolin/Ess8 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 24% έως 63%.  $\text{IC}_{50}=148 \mu\text{M}$ .

Luteolin 7-O- glucoside/Kmm1 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 1.25, 2.5, 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 4% έως πλήρη αναστολή.  $\text{IC}_{50}=4.5 \mu\text{M}$ .

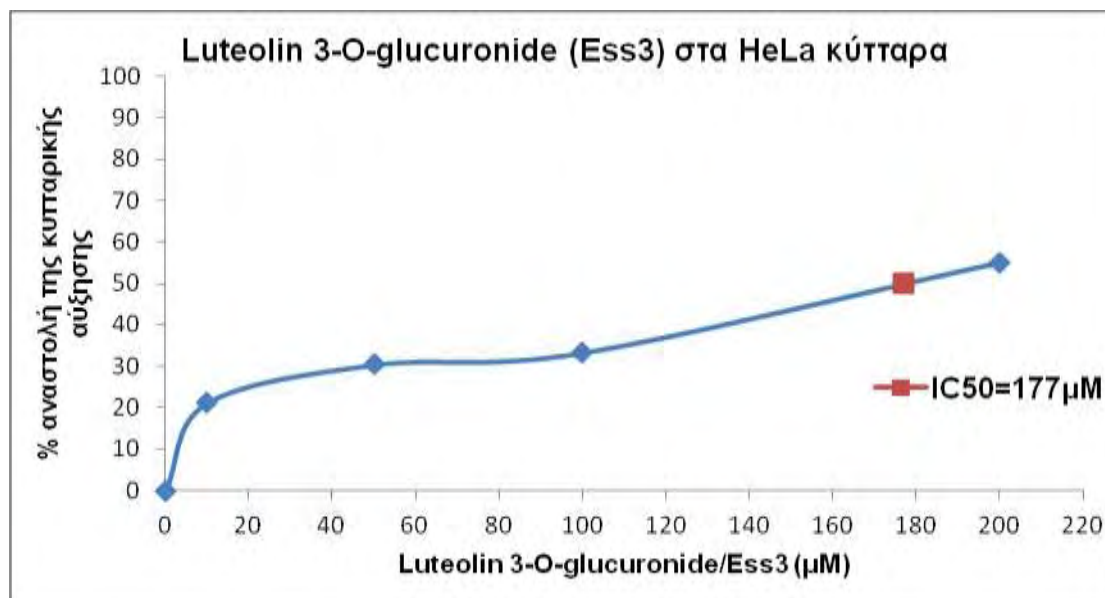
Luteolin 7-O- rutinoideside/Kmm2 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 0.625, 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 14% έως 97%.  $\text{IC}_{50}=4.5 \mu\text{M}$ .

Rosmarinic acid/Kmm4 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 19% έως σχεδόν πλήρη αναστολή.  $\text{IC}_{50}=70 \mu\text{M}$ .

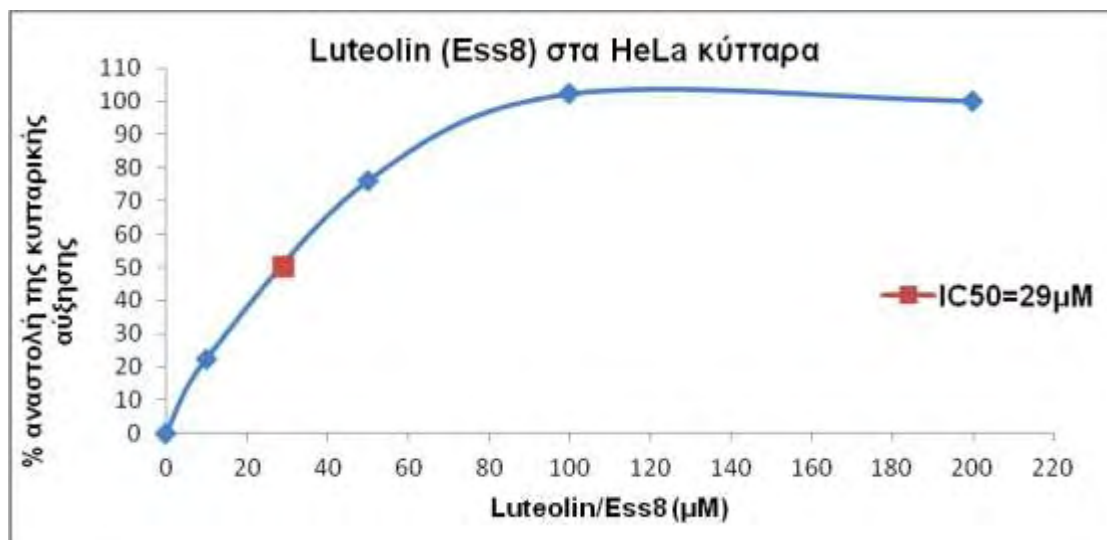
Eriodictyol 7-O- rutinoideside/Kmm5 - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και έδωσε τιμές αναστολής από 25% έως σχεδόν πλήρη αναστολή.  $\text{IC}_{50}=23 \mu\text{M}$ .



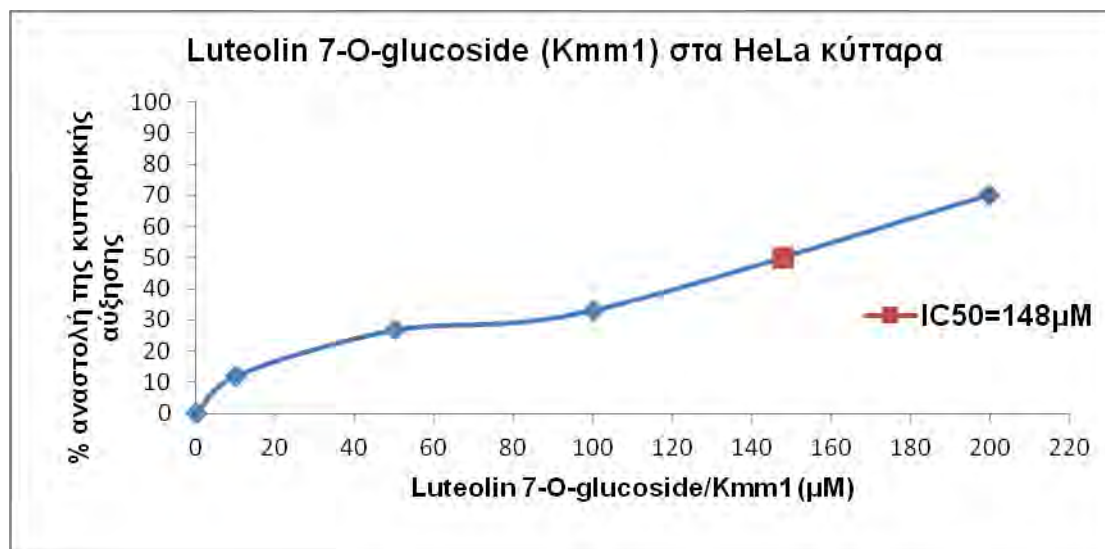
**Γράφημα 1:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από το salvianolic acid K (Ess1).



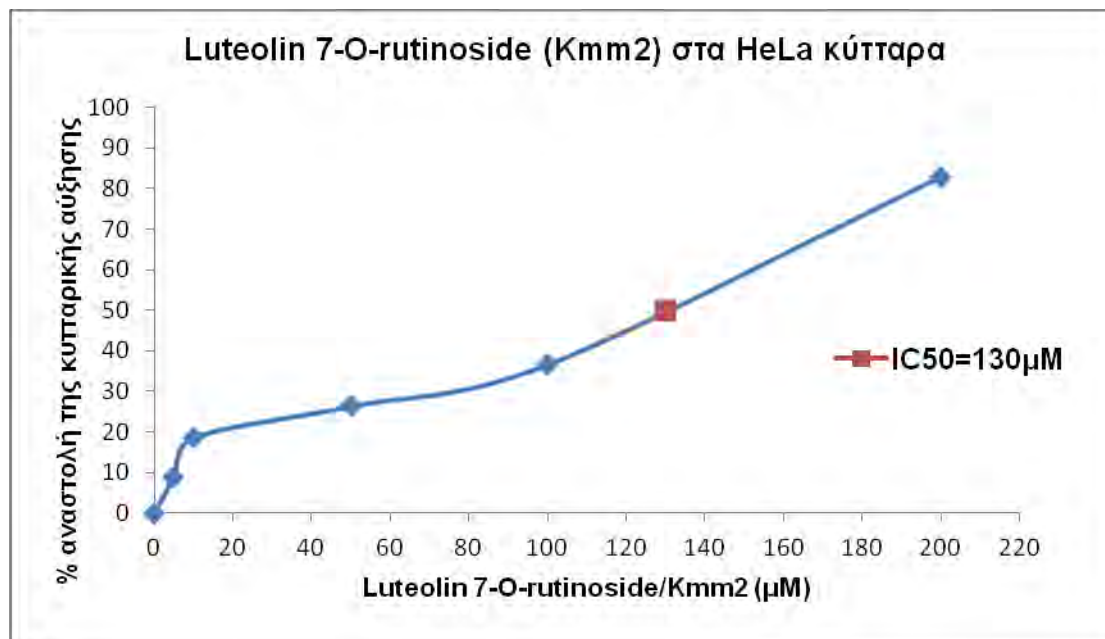
**Γράφημα 2:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin 3-O-glucuronide (Ess3).



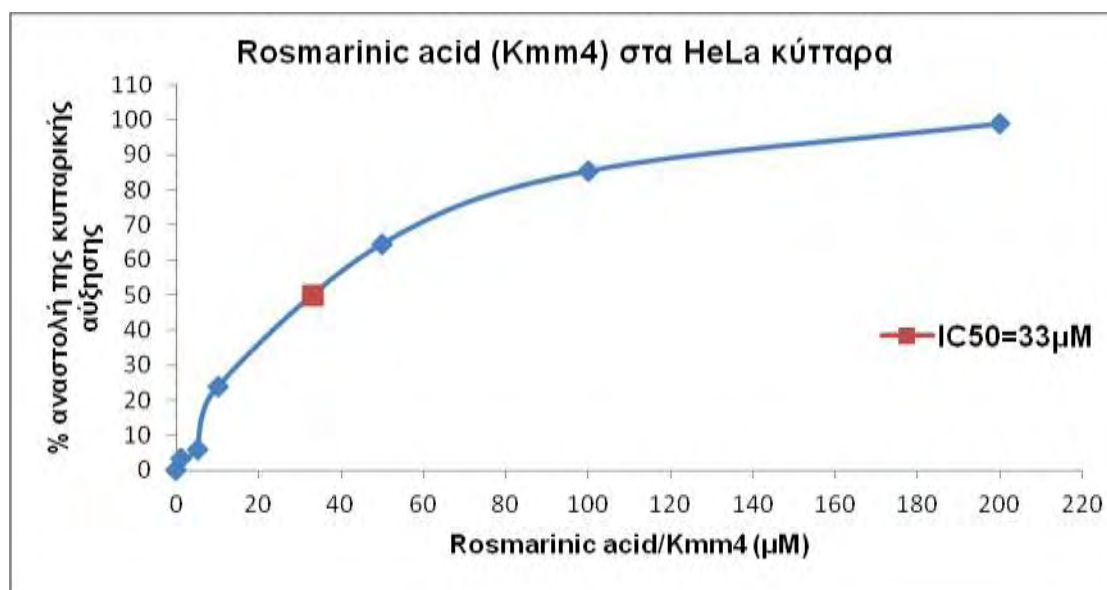
**Γράφημα 3:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin (Ess8).



**Γράφημα 4:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin 7-O-glucoside (Kmm1).

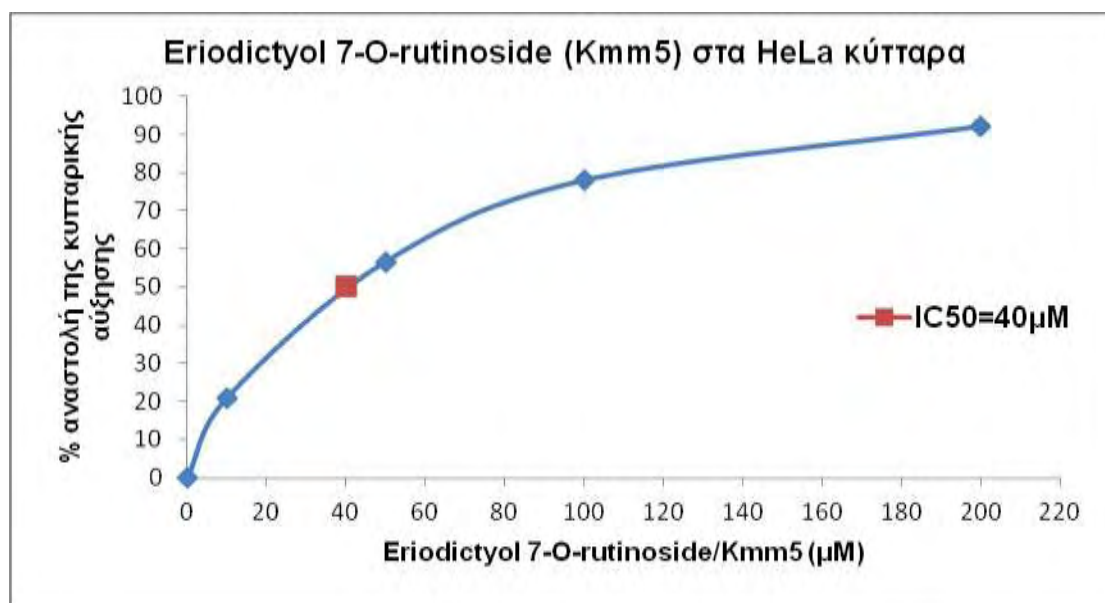


**Γράφημα 5:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από τη luteolin 7-O-rutinoside (Kmm2).

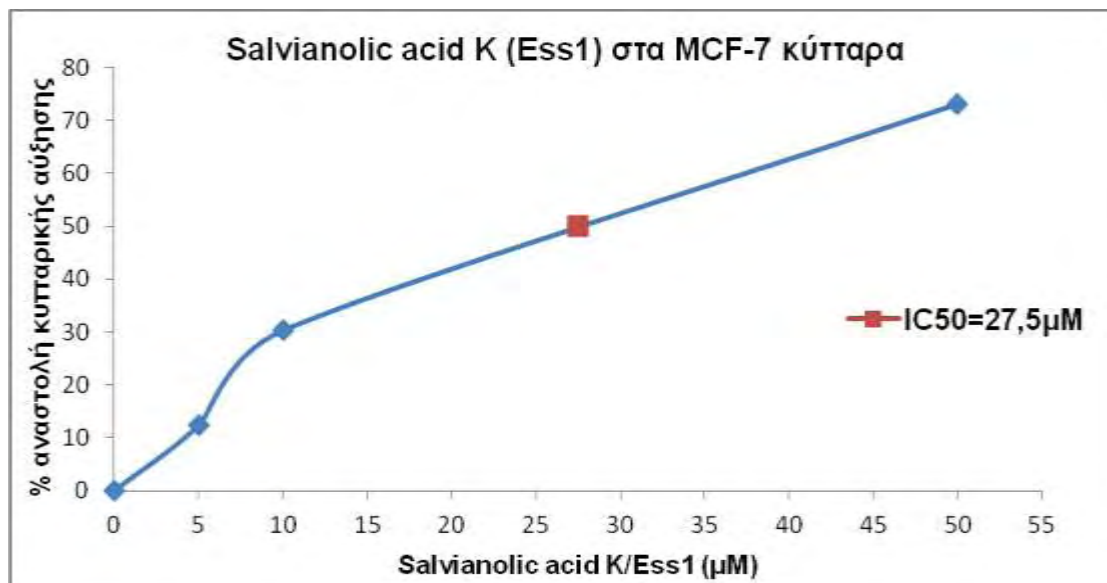


**Γράφημα 6:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από το Rosmarinic acid (Kmm4).

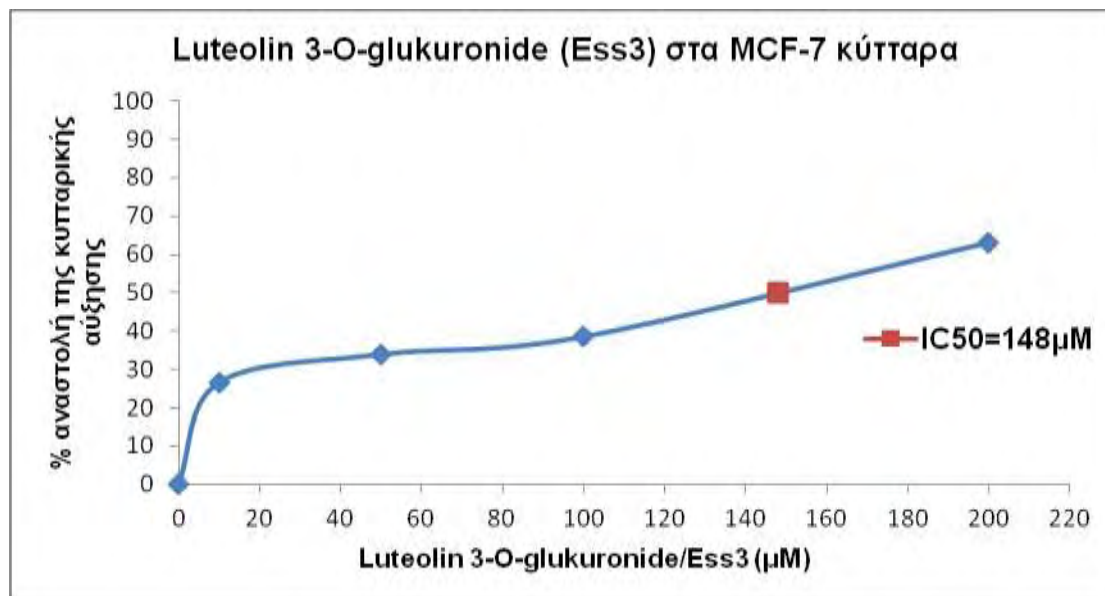




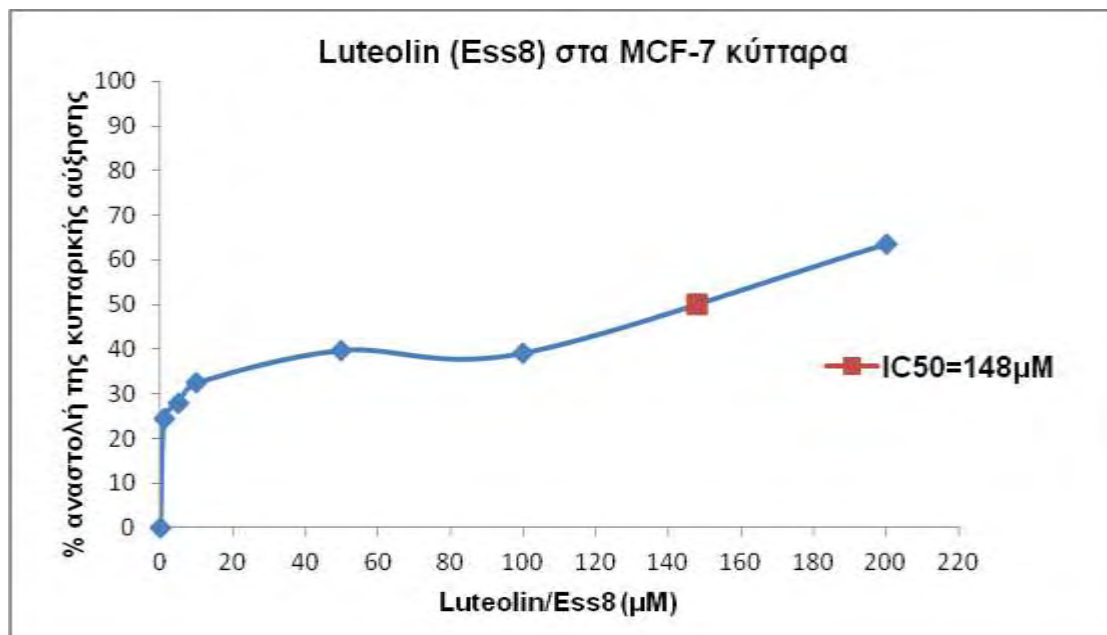
**Γράφημα 7:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HeLa κυττάρων από την eriodictyol 7-O-rutinoside (Kmm5).



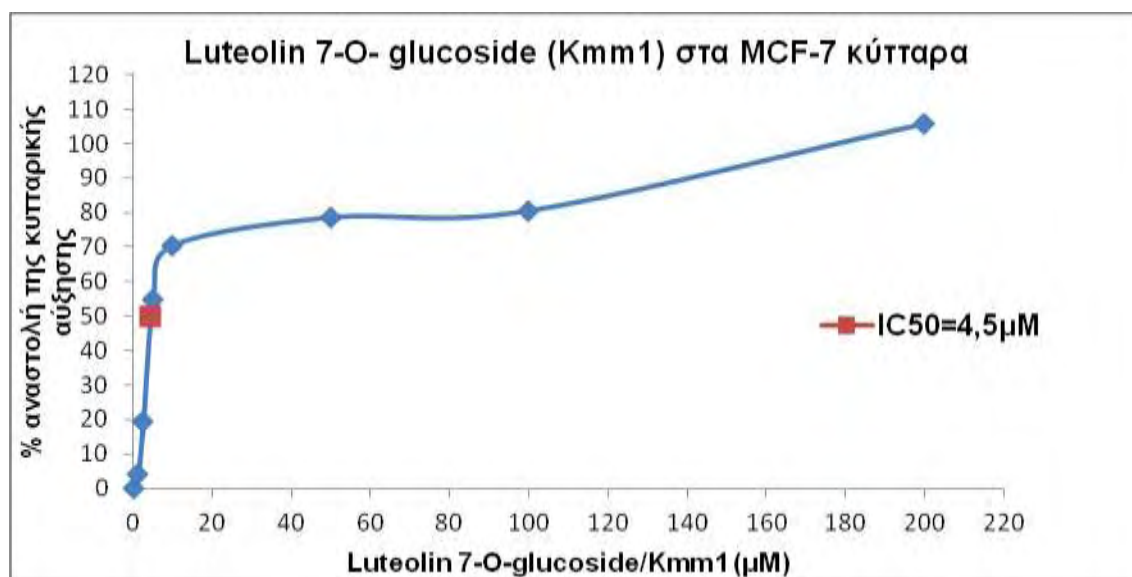
**Γράφημα 8:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το salvianolic acid K (Ess1).



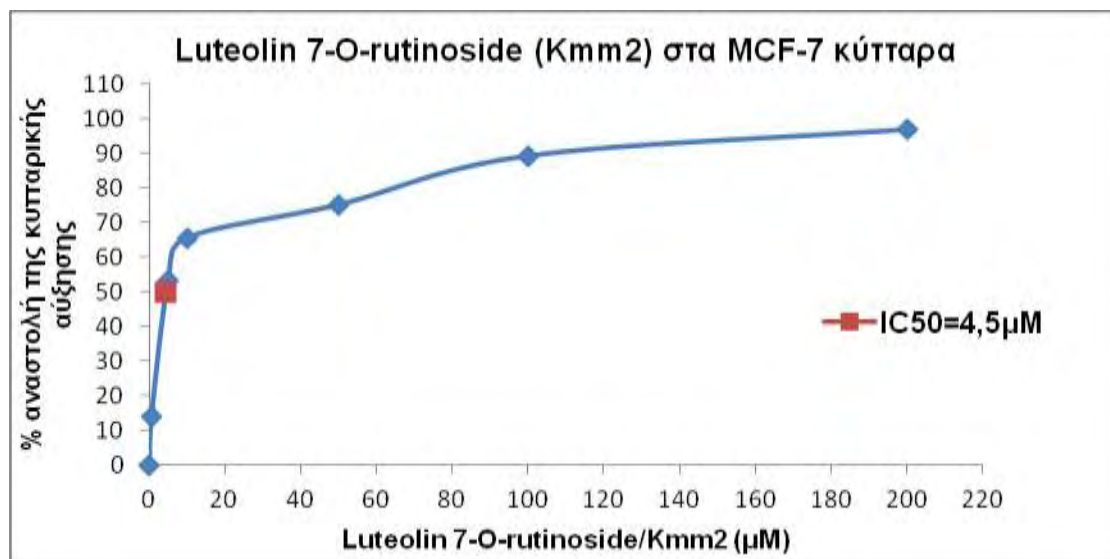
**Γράφημα 9:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin 3-O-glucuronide (Ess3).



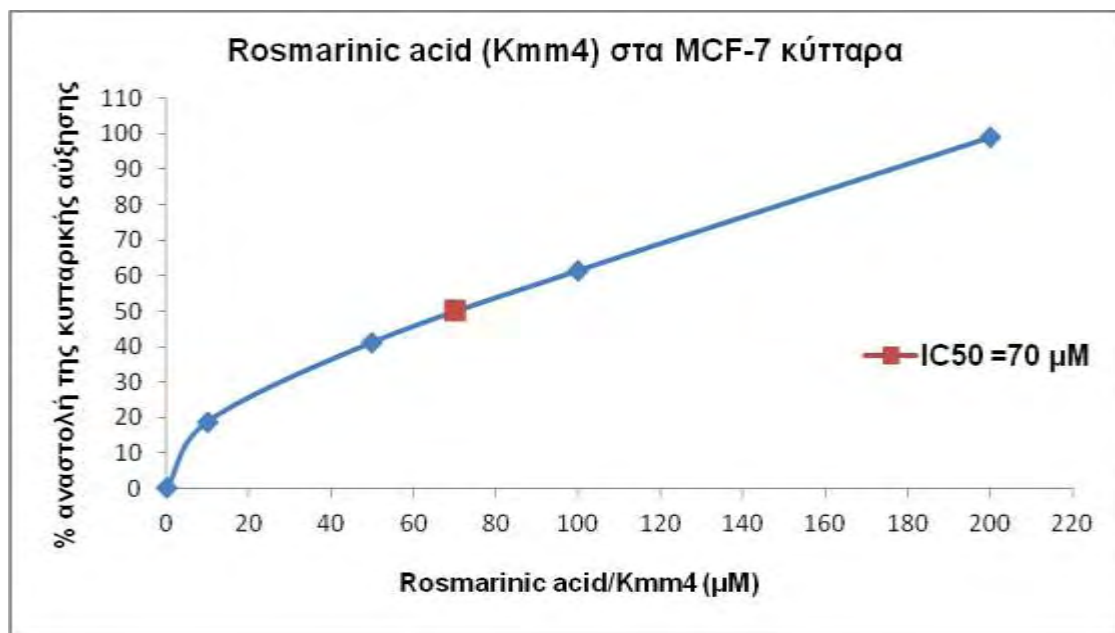
**Γράφημα 10:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin (Ess8).



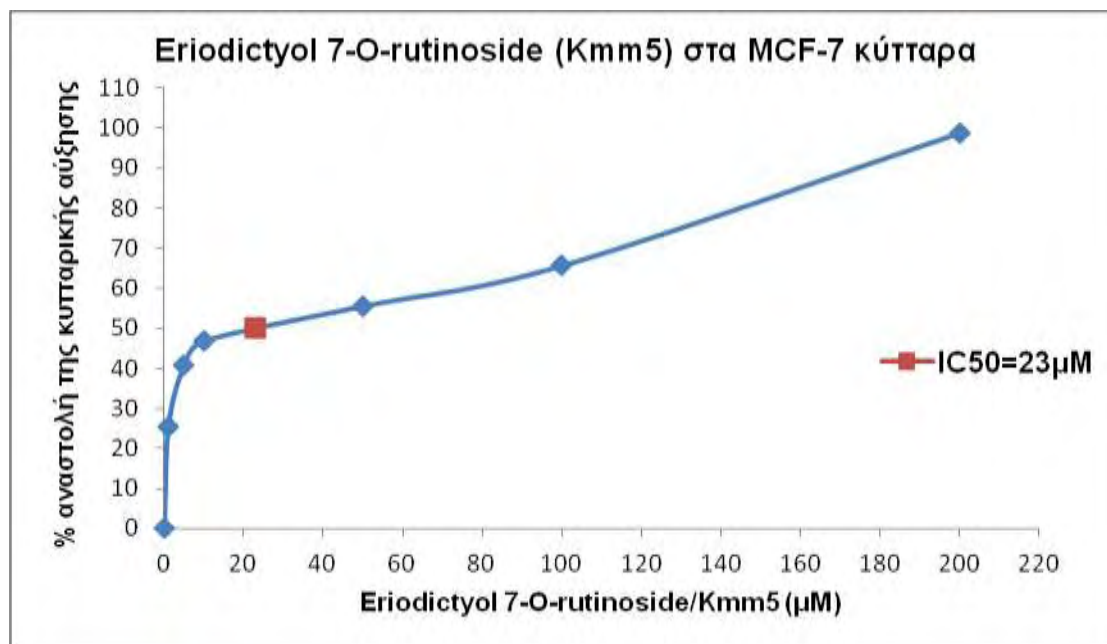
**Γράφημα 11:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin 7-O-glucoside (Kmm1).



**Γράφημα 12:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από τη luteolin 7-O-rutinoside (Kmm2).

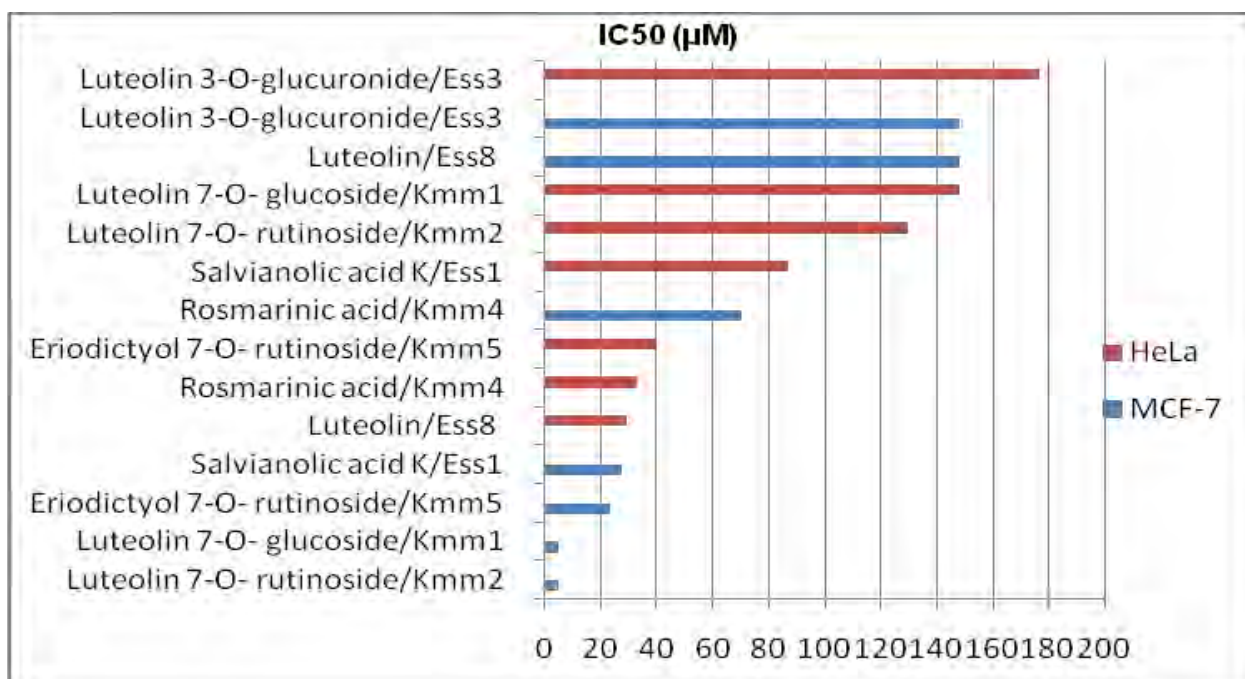


**Γράφημα 13:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Rosmarinic acid (Kmm4).



**Γράφημα 14:** Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από την eriodictyol 7-O-rutinoside (Kmm5).





**Γράφημα 15:** Απεικονίζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> των πολυφαινολών συγκριτικά στις δύο κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεν χώρα αμφιβολία ότι ο καρκίνος αποτελεί μάστιγα για την κοινωνία μας. Βέβαια η συγκεκριμένη ασθένεια δεν είναι σύγχρονη και είναι χαρακτηριστικό ότι ο Ιπποκράτης είναι αυτός που της έδωσε το συγκεκριμένο όνομα, ενώ όγκοι στο ανθρώπινο σώμα είχαν περιγραφεί από αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους μελετητές. Σήμερα όμως εξαιτίας πολλαπλών παραγόντων γινόμαστε διαρκώς μάρτυρες της δυναμικής της συγκεκριμένης νόσου. Κατά την πλειονότητά της (>70%) η εκδήλωση του καρκίνου οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (καρκινογόνα μόρια στα τρόφιμα και την ατμόσφαιρα, διαίτα, κάπνισμα κ.α.), σε ένα ποσοστό όμως παραμένει γενετικό νόσημα, όχι με την αυστηρή έννοια του όρου αλλά ως μεγαλύτερη προδιάθεση ορισμένων ομάδων πληθυσμού για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου (Σκορίλας Α. 2008). Ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου, μετά τα καρδιαγγειακά, στον δυτικό κόσμο. Ο όρος αναφέρεται σε περίπου 150-200 διαφορετικές παθήσεις που έχουν ωστόσο δύο κοινά χαρακτηριστικά, τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τις δυσλειτουργίες που αυτός προκαλεί. Μας είναι γνωστό πλέον ότι η καρκινογένεση είναι μια πολυσύνθετη διεργασία σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μια εκτεταμένη χρονικά περίοδο μεταξύ της αρχικής φάσης και της εμφάνισης της νόσου. Η καρκινογένεση παρομοιάζεται με ένα ‘παγόβουνο’. Δημιουργείται σταδιακά και μακροχρονίως. Όταν επιτέλους η κορυφή του ανιχνευτεί με τις διαγνωστικές μεθόδους τότε προσπαθούμε να το καταστρέψουμε με βίαια μέσα (χημειοθεραπευτικές τοξικές ουσίες, εγχειρήσεις και ακτινοθεραπείες). Βέβαια δεν καταστρέφεται διότι ο μεγαλύτερος όγκος του είναι κάτω από την επιφάνεια της ‘θάλασσας’ και εμείς με τις καθιερωμένες προσεγγίσεις κτυπάμε μόνο την κορυφή του ‘παγόβουνου’. (Κωνσταντίνου Α, 2008). Παρά την μεγάλη πρόοδο που έχει συντελεστεί στην βασική επιστημονική γνώση σχετικά με τον καρκίνο καθώς και την κλινική αντιμετώπιση και ίαση κάποιων κακοηθειών (κάποιες μορφές λευχαιμιών και λεμφωμάτων) είναι γεγονός πως η συνολική αντιμετώπισή του παραμένει στόχος προς εκπλήρωση. Επιπλέον ο ρυθμός θνησιμότητας κάποιων μορφών καρκίνου συνέχισε να αυξάνει. Προς το παρόν η βασική και κλινική έρευνα στον καρκίνο οδηγούνται από τον λανθασμένο στόχο της ίασης προχωρημένων ασθενειών, μια προσέγγιση συχνά μη ρεαλιστική εξαιτίας της γενετικής ετερογένειας και έκτασης

των όγκων προχωρημένου σταδίου.( Sporn MB, Suh N. 2000). Επιπροσθέτως η αντίληψη του καρκίνου ως ασθένειας με κυριότερο χαρακτηριστικό την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση οδήγησε να δοθεί έμφαση στην ανάπτυξη κυτταροτοξικών φαρμάκων τα οποία όμως είναι τοξικά και σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιστών. Τελικά οι συνεχιζόμενες διαστάσεις του προβλήματος του καρκίνου και η αποτυχία των συμβατικών χημειοθεραπευτικών προσεγγίσεων σε εξελιγμένες διηθητικές ασθένειες να μειώσουν αποτελεσματικά τα ποσοστά θνησιμότητας, υποδεικνύει ότι απαιτούνται νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου.

Μια σοβαρή εναλλακτική προσέγγιση αντιμετώπισης του προβλήματος του καρκίνου είναι η χημειοπροφύλαξη. Χημειοπροφύλαξη (ή χημειοπροστασία) είναι η πρόληψη του καρκίνου στους ανθρώπινους πληθυσμούς μέσω της κατάποσης μη τοξικών χημικών ουσιών που αναστέλλουν, αντιστρέφουν ή καθυστερούν τη διαδικασία της καρκινογένεσης. (Sporn M.B, et al 1976). Η χημειοπροφύλαξη αποσκοπεί στην ελάττωση του κινδύνου καρκίνου με τη χρήση ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης και διαφέρει από την πρόληψη που αναφέρεται στην αλλαγή συνηθειών (καλύτερη διατροφή, άσκηση, αποφυγή καπνίσματος). Η στρατηγική χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο: την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνισή του (primary prevention) και την έγκαιρη ανίχνευση, αναστροφή και περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et al., 2001, Smith et al., 2005). Σήμερα η χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου, ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et al, 2004, Surch, 2003).

Κυρίαρχη θέση μεταξύ των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων κατέχουν οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Σπανού Χ., 2010). Υπάρχουν στα φρούτα , τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα χειλανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί κ.α. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια και ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί στην χημειοπροφυλακτική δράση των πολυφαινολών που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής. Φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες δρουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την

κυτταρική αύξηση, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Bidlack WR, et al, 2000).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η επίδραση καθαρών πολυφαινολικών μορίων, που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα των φυτών *Salvia sclarea* και *Mentha microphylla*, στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa (κύτταρα του τραχήλου της μήτρας) και MCF-7 (κύτταρα μαστού). Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος περισσότερο διαδεδομένος τύπος καρκίνου μεταξύ των γυναικών. Ξεκινά από προκαρκινικές αλλοιώσεις που συνήθως μετά από αρκετά χρόνια μετατρέπονται σε αληθείς διηθητικούς καρκίνους. Επεμβαίνοντας στο αρχικό στάδιο και θεραπεύοντας όλους τους προκαρκίνους μπορούμε να προλάβουμε σχεδόν όλους τους αληθείς καρκίνους. Υπό την παραπάνω άποψη εξετάστηκαν και οι πολυφαινόλες για πιθανή επίδρασή τους στα HeLa κύτταρα. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών με περίπου 1.000.000 νέα κρούσματα παγκοσμίως. Συνιστά το 22.9% μεταξύ όλων των τύπων καρκίνων, (εκτός των μη μελανοματωειδών καρκίνων του δέρματος), που εμφανίζονται στις γυναίκες, ενώ το 2008 σε αυτόν οφείλονταν το 13.7% των θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες ( "World Cancer Report", 2008 ). Υπολογίζεται ότι μία στις οκτώ γυναίκες θα εμφανίσει κάποια στιγμή της ζωής της αυτό τον τύπο καρκίνου. Τα αίτια για τον καρκίνο του μαστού δεν είναι ξεκάθαρα, ενώ ως παράγοντες κινδύνου έχουν αναφερθεί διάφοροι (φύλο, ηλικία, κληρονομικότητα, διαταραχές έμμηνου ρύσης, αλκοόλ κ.α.). Γενικά ο καρκίνος του μαστού δεν μπορεί να προληφθεί πρωτογενώς καθώς αγνοούμε ακόμα τον σαφή παράγοντα δημιουργίας του.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν επτά καθαρά πολυφαινολικά μόρια. Τρία που απομονώθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*: salvianolic acid K, luteolin 3-O-glucuronide, luteolin και τέσσερα που απομονώθηκαν από αιθανολικό εκχύλισμα της *Mentha microphylla*: luteolin 7-O-glucoside, luteolin 7-O-rutinoside, rosmarinic acid και eriodictyol 7-O-rutinoside. Να αναφέρουμε πως εκτός της luteolin, του rosmarinic acid και των salvianolic acid A,B για τα υπόλοιπα μόρια δεν υπήρχαν παρά ελάχιστες αναφορές στην βιβλιογραφία. Επιπλέον αναφορές για αντικαρκινική δράση των παραπάνω μορίων στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7 υπήρξαν από ελάχιστες έως καθόλου.

Πιο συγκεκριμένα το salvianolic acid K εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 1, 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  στα HeLa κύτταρα δίνοντας τιμές αναστολής από 1% έως 75%. Η τιμή  $\text{IC}_{50}$  προσδιορίστηκε στα 87  $\mu\text{M}$ . Στα MCF-7 κύτταρα μελετήθηκε στις συγκεντρώσεις 5, 10 και 50  $\mu\text{M}$  στις οποίες προέκυψε αναστολή της κυτταρικής αύξηση από 12% έως 73% με  $\text{IC}_{50}=27.5 \mu\text{M}$ . Όσον αφορά την βιβλιογραφία για το salvianolic acid K δεν υπάρχουν αναφορές, αλλά μόνο για τα salvianolic acid A και B. Έτσι σύμφωνα με μια αναφορά το Salvianolic acid B είναι ένα φαινολικό οξύ πλούσιο στα βότανα με ισχυρή φαρμακευτική δραστηριότητα. Χρησιμοποιείται εναντίον καρδιαγγειακών και εγκεφαλικών ασθενειών, ενάντια στην ηπατική και τη νεφρική ίνωση, ως προληπτικό του καρκίνου και για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων. Ως προς τους μηχανισμούς δράσης του κάποιες μελέτες έγιναν όσον αφορά τις καρδιοεγκεφαλικές ασθένειες ενώ ελάχιστες υπάρχουν για τις υπόλοιπες περιπτώσεις (Cao W, et al, 2012). Σε άλλη εργασία αναφέρεται πως σε συγκέντρωση salvianolic acid B 0-20  $\mu\text{M}$  δεν παρατηρείται επίδραση στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων, ενώ σε συγκεντρώσεις 100-250  $\mu\text{M}$  παρατηρείται σημαντική δόσοεξαρτώμενη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων (Wang QL, et al, 2011). Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του Salvianolic acid K σε συγκέντρωση κάτω από 100  $\mu\text{M}$  και στις δύο κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7. Σχετικά με το Salvianolic acid A υπάρχει μελέτη που προτείνει ότι μπλοκάρει τη μεταφορά νουκλεοτιδίων σε καρκινικά κύτταρα και προστατεύει από την κυτταροτοξικότητα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ( Zhang SH, et al 2004).

Η luteolin 3-O-glucuronide (Ess3) εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$  και στις δύο κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7. Έδωσε τιμές αναστολής της κυτταρικής αύξησης από 20% έως 54% και  $\text{IC}_{50}=177 \mu\text{M}$  στα HeLa και από 26% έως 63% και  $\text{IC}_{50}=148 \mu\text{M}$  στα MCF-7 κύτταρα. Παρατηρείται δηλαδή μια ομοιογενής δράση της ουσίας και στις δύο κυτταρικές σειρές. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει αναφορά για δράση της συγκεκριμένης ουσίας στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, ενώ υπάρχει μια αναφορά για αντιφλεγμονώδη δράση της (Ismaili H, et al 2002).

Η luteolin εξετάστηκε στα HeLa κύτταρα (συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu\text{M}$ ) και προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αναστολή από 22% έως πλήρη αναστολή. Η τιμή  $\text{IC}_{50}$  ήταν 29  $\mu\text{M}$ . Στα MCF-7 κύτταρα όμως ήταν λιγότερο δραστική στα πειράματά μας με αναστολή της κυτταρικής αύξησης έως 63% στη συγκέντρωση των 200  $\mu\text{M}$

και  $IC_{50}=148\ \mu M$ . Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως π.χ. η διαφορετική φυσιολογία και λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτή. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικές με την αντι-οξειδωτική και αντικαρκινική δράση της luteolin. Η luteolin αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων και πυροδοτεί μιτοχονδριακά-εξαρτώμενη απόπτωση σε αυτά (Chen Q et al, 2012). Σε άλλη μελέτη χαμηλές συγκεντρώσεις luteolin είχαν μικρή τοξική επίδραση στα κύτταρα, αλλά ευαισθητοποιούσαν χημειοθεραπευτικά φάρμακα σε διάφορες καρκινικές σειρές (Wang HY, et al, 2010). Επίσης λίγες αναφορές υπάρχουν σχετικά με την ανασταλτική επίδραση της luteolin στα MCF-7 κύτταρα (Li F, et al 2011, Wang T, et al 2007, Han D, et al 2001).

Η luteolin 7-O-glucoside στα HeLa κύτταρα στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200  $\mu M$  προκάλεσε αναστολή της αύξησης από 12% έως 70% δοσοεξαρτώμενα και είχε  $IC_{50}=148\ \mu M$ . Στα MCF-7 κύτταρα εκτιμήθηκε η δράση της σε συγκεντρώσεις 1.25, 2.5, 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu M$  και επέδειξε ισχυρή αναστολή της κυτταρικής αύξησης από 4% έως πλήρη αναστολή.  $IC_{50}=4.5\ \mu M$ . Δηλαδή το συγκεκριμένο μόριο ενώ είχε εξαιρετικά ισχυρή επίδραση στα MCF-7 κύτταρα τουναντίον στα HeLa είχε μια πολύ μέτρια δράση σύμφωνα με τα δεδομένα της εργασίας μας. Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια αναφορά για ανασταλτική επίδραση στην κυτταρική σειρά MCF-7 εκχυλίσματος του φυτού *Ixeris denticulata f. pinnatipartita* που περιέχει την luteolin 7-O-glucoside. (Ma JY, et al, 1999).

Η luteolin 7-O-rutinoside εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 5, 10, 50, 100 και 200  $\mu M$  στην κυτταρική σειρά HeLa και έδρασε ανασταλτικά της αύξησης των κυττάρων από 9% μέχρι 83% στην μεγαλύτερη συγκέντρωση και η τιμή  $IC_{50}$  ήταν ίση με 130  $\mu M$ . Στην έτερη κυτταρική σειρά MCF-7 επέδειξε σημαντικά ενισχυμένη δράση με αναστολή της κυτταρικής αύξησης σε ποσοστό 97% σε συγκέντρωση 200  $\mu M$  και  $IC_{50}=4.5\ \mu M$ . Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την συγκεκριμένη πολυφαινόλη.

Το rosmarinic acid εξετάστηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7 και προκάλεσε σχεδόν πλήρη αναστολή της κυτταρικής αύξησης σε συγκέντρωση 200  $\mu M$ . Η τιμή  $IC_{50}$  ισούται για μεν τα HeLa με 33  $\mu Mol$ , για δε τα MCF-7 με 70  $\mu M$ . Γενικά φαίνεται να έχει ισχυρή δράση και στις δύο καρκινικές σειρές. Από τη σχετική βιβλιογραφία των ετών 1996-2010 ύστερα από μελέτες σε ζώα και κυτταρικές σειρές, αποδεικνύεται η αντικαρκινική ιδιότητα του εκχυλίσματος από

δενδρολίβανο και των συστατικών του καρνοσόλης, καρνοσικού οξέος, ουρσολικού οξέος και ροσμαρινικού οξέος στην καταστολή ανάπτυξης όγκων σε διάφορα όργανα όπως το ήπαρ, ο μαστός, το κόλον και το στομάχι καθώς και η δράση τους έναντι του μελανώματος και της λευχαιμίας. Όσον αφορά τα HeLa κύτταρα σύμφωνα με μια μελέτη το ροσμαρινικό οξύ επέδειξε χημειοπροστατευτική δραστηριότητα, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική καταστροφή του DNA και διεγείροντας μηχανισμούς επιδιόρθωσής του (Ramos AA, et al 2010), ενώ στα MCF-7 κύτταρα υπάρχει μια εργασία σχετικά με την χημειοπροστατευτική δράση του σε κακοήθεις και καλοήθεις όγκους μαστικών επιθηλιακών κυττάρων δρώντας εναντίον της ενεργοποίησης της κυκλοοξυγενάσης-2 (Scheckel KA, et al 2008).

Η eriodictyol 7-O-rutinoside προκάλεσε μέγιστη αναστολή της αύξησης των HeLa κυττάρων σε ποσοστό 92% στη συγκέντρωση των 200  $\mu\text{M}$  με τιμή  $\text{IC}_{50}=40 \mu\text{M}$ . Στα MCF-7 κύτταρα είχε ελαφρώς ισχυρότερη δράση επιδεικνύοντας σχεδόν πλήρη αναστολή της κυτταρικής αύξησης στην ίδια συγκέντρωση και έδωσε τιμή  $\text{IC}_{50}=23 \mu\text{M}$ . Πέραν μεμονωμένων αναφορών στην αντιοξειδωτική δράση της eriodictyol 7-O-rutinoside δεν υπάρχει κάποια αναφορά σε αντικαρκινική της δράση και μάλιστα στις κυτταρικές σειρές που μελετήσαμε στην διεθνή βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι όλα τα πολυφαινολικά μόρια που εξετάστηκαν επέδειξαν ανασταλτική δράση ως προς την αύξηση και των δύο μελετηθέντων κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7. Βέβαια αυτή η δράση σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρουσιάζει αξιοσημείωτη ετερογένεια τόσο μεταξύ των μορίων όσο και μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Αυτή μπορεί να εξηγηθεί πολλαπλώς λαμβάνοντας υπόψη τα ίδια τα μόρια αλλά κυρίως τα κύτταρα, την φύση και λειτουργία τους στην οποία και εμπλέκονται πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί. Η συγκέντρωση που οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αξιόλογη επίδραση στην αύξηση των κυττάρων, μας ενδιαφέρει γιατί έχει άμεση συσχέτιση με την ανοχή των κυττάρων σε αυτές. Αυτή η εργασία μας δίνει μια πρώτη εικόνα σχετικά με την επίδραση των συγκεκριμένων πολυφαινολών στις κυτταρικές σειρές HeLa και MCF-7 αφού εκτός ελαχίστων αναφορών για τις luteolin και rosmarinic acid για τις υπόλοιπες δεν υπήρχε καμία σχετική αναφορά. Για την πρόοδο της έρευνας στο συγκεκριμένο πεδίο μένει να ακολουθήσουν και άλλες εργασίες που θα εξετάζουν την επίδραση των παραπάνω μορίων και σε άλλες κυτταρικές σειρές, τους μηχανισμούς δράσης τους καθώς και τα επίπεδα ανεκτικότητάς τους από τον οργανισμό.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Κουλάδη Μαρία , 2005. *Χημικά συστατικά ειδών του γένους Salvia L.* Πρακτικά επιστημονικής διημερίδας: «Το Ελληνικό Φασκόμηλο» , Ζαγορά Πηλίου, 25 & 26 Ιουνίου **2005** Υπό την αιγίδα του Πανελληνίου φαρμακευτικού συλλόγου.
- Κουρέτας Δ. *Βιοχημική Τοξικολογία*. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, **2003**.
- Κωνσταντίνου Α. *Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου*. Περغامνή-Ετήσια έκδοση του Πανεπιστημίου Κύπρου **2008**
- ΛΑΖΑΡΗ Δ, **2005**. *Το Ελληνικό Φασκόμηλο*. Πρακτικά συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Εθνοφαρμακολογίας Ζαγορά Πηλίου, 25 & 26 Ιουνίου 2005
- Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α. *Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία*. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 11:6-14, **1997**.
- Σπανού Χρυσούλα. *Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών*. **2010**.
- Σκορίλας Ανδρέας. *Αρχές κλινικής χημείας και μοριακής διαγνωστικής*. Αθήνα 2008.
- Aceves C, Anguiano B, Delgado G. (2005). "Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland?". Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 10(2):189–196.
- Adlercreutz H, Mazur W. *Phyto-oestrogens and Western diseases*. Ann Med. **1997** 29:95–120.
- Afifi FU, Abu-Dahab R. *Phytochemical screening and biological activities of Eminium spiculatum (Blume) Kuntze (family Araceae)*. Nat Prod Res. **2012**;26(9):878-82. Epub 2011 Aug 2
- Bayrak, A. & Akgul A. (1987). *Composition of essential oil from Turkish Salvia species*. Phytochemistry, 26, 846–847
- BBC report, Weight link to breast cancer risk
- Beibei Lu, Ambuj Kumar, Xavier Castellsagué, Anna R Giuliano. *Efficacy and Safety of Prophylactic Vaccines against Cervical HPV Infection and*



*Diseases among Women: A Systematic Review & Meta-Analysis* .BMC Infect Dis. **2011**; 11: 13.

- Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. *Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity*. Drugs Exp Clin Res. **1998** 24:133–138.
- Bidlack WR, Omay ST, Meskin MS, Topham DKW, **2000**. *Phytochemicals as bioactive agents*. CRC Press
- Bode AM, Dong Z. *Molecular and cellular targets*. Mol Carcinog., 45:422–430, **2006**.
- Brickell Christopher, Zuk Judith D. (**1997**). *The American Horticultural Society: A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. New York, NY, USA: DK Publishing. p. 668. ISBN 0-7894-1943-2
- Brown JE, Rice-Evans CA. *Luteolin rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro*. Free Radical Research **1998**;29:247–255.
- Bunsawat Jiranan, Elliott Natalina E, Hertweck Kate L, Sproles Elizabeth, Alice Lawrence A. (**2004**). "*Phylogenetics of Mentha (Lamiaceae): Evidence from Chloroplast DNA Sequences*". Systematic Botany 29 (4): 959–64.
- Cao W, Guo XW, Zheng HZ, Li DP, Jia GB, Wang J. *Current progress of research on pharmacologic actions of salivianolic acid B*. Chin J Integr Med. **2012** Apr;18(4):316-20.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adelaide J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F. (**2006**). "*Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers*". Oncogene 25 (15):2273–2284. DOI:10.1038/sj.onc.1209254.
- Chen Q, Liu S, Chen J, Zhang Q, Lin S, Chen Z, Jiang J. *Luteolin induces mitochondria-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma cell*. Nat Prod Commun. **2012** Jan;7(1):29-32.
- Cheynier V. *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. Am J Clin Nutr, 81:223-9, **2005**
- Chlebowski RT, Blackburn GL, Thomson CA, et al. (December **2006**). "*Dietary fat reduction and breast cancer outcome: interim efficacy results*

- from the Women's Intervention Nutrition Study". Journal of the National Cancer Institute 98 (24): 1767–76.*
- Clebsch Betsy, Carol D. Barner (2003). *The New Book of Salvias*. Timber Press. p. 18. ISBN 978-0-88192-560-9.
  - Clifford MN, Scalbert A. *Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention*. J Food Sci Agric. **2000** 80:1118–1125.
  - Clifford MN. *Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden*. J Food Sci Agric. **2000** 80:1063–1072
  - Croce CM, (January 2008). "Oncogenes and cancer". The New England Journal of Medicine 358 (5):50211. DOI:10.1056/NEJMra072367.
  - Crozier A, Clifford M.N, Ashihara J. *Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing, **2006**
  - D. Baricevic, S. Sosa, R. Della Loggia, A. Tubaro, B. Simonovska, A. Krasna and A. Zupancic. (2001). *Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid*. Journal of Ethnopharmacology 75:125-132
  - De Flora S, Ferguson L. *Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents*. Mut Res, 591: 8-15, **2005**.
  - De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albini A. *Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases*. Mutat Res. **2001** 480-481:9-22.
  - Dew TP, Day AJ, Morgan MR., **2005**. *Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components*. J Agric Food Chem Aug 10;53(16):6510-5.
  - Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. Life Sci. **1999**;65(4):337-53.
  - Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. *Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis*. Carcinogenesis. **1988** 9:331-332.
  - Fearon ER, Vogelstein B, (June 1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis". Cell 61 (5):759–67.

- Florescu, A, Amir E, Bouganim N, Clemons M. (2011). "Immune therapy for breast cancer in 2010—hype or hope?" *Current Oncology* 18 (1): e9–e18.
- Gebhardt R. *New experimental results in the action of artichoke leaf extract.* *Zeitschrift fur Allgemeinmed* 1996;72:20–23.
- Han D, Tachibana H, Yamada K. *Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001 May;37(5):275-82.
- Harborne JB. *Nature, distribution and function of plant flavonoids.* *Prog Clin Biol Res.* 1986;213:15-24.
- Hartman PE, Shankel DM. *Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules.* (1990), *Environ Mol Mutagen*, 15: 145-182
- Hill DL, Grubbs CJ. *Retinoids and cancer prevention.* *Annu Rev Nutr.* 1992 12:161-181.
- Hohmann J, Zupko I, Redei D, Csanyi M, Falkay G, Mathe I, et al. (1999). *Protective effects of the aerial parts of Salvia officinalis, Melissa officinalis and Lavandula angustifolia and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation.* *Planta Medica*, 65, 576–578
- <http://www.cancer.org>
- Huang FL, Roop DR, De Luca LM. *Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea.* *In Vitro Cell Dev Biol.* 1986 22:223.
- Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. *Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis.* *Cancer Res.* 1991 51:813-819.
- Ismaili H, Sosa S, Brkic D, Fkih-Tetouani S, Ilidrissi A, Touati D, Aquino RP, Tubaro A. *Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from Thymus broussonettii.* *J Pharm Pharmacol.* 2002 Aug;54(8):1137-40.
- Jaffe LF. (2003). "Epigenetic theories of cancer initiation." *Advances in cancer research.* *Advances in Cancer Research* 90: 209–30.
- Jalsenjak V, Peljnajak S. & Kustrak D. (1987). *Microcapsules of sage oil, essential oils content and antimicrobial activity.* *Pharmazie.* 42, 419-420.
- Johnson, Kelley KW, Johnson, RW (May 2008). "Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of API". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105 (21):75349.

- Jordan VC. *The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer*. Cancer. **1992** 70:977s-982s
- Kayoko Shimoi, Hisae Okada, Michiyo Furugori, Toshinao Goda, Sachiko Takase, Masayuki Suzuki, Yukihiko Hara, Hiroyo Yamamoto, Naohide Kinae (**1998**). *Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-[beta]-glucoside in rats and humans*. FEBS Letters 438 (3): 220–4.
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC. *Inhibition of chemical carcinogenesis*. In: *Chemical induction of cancer modulation and combination of effects*. Arcos J, Argus M, Woo Y eds. Birkhauser: Boston, USA, **1997**.
- Kelloff GJ, Hawk ET, Sigman CC. *Cancer chemoprevention. Strategies for cancer chemoprevention*. Vol e. Humana Press, **2005**.
- Kennedy AR. *Chemopreventive agents: protease inhibitors*. Pharmacol Ther. **1998** 78:167-209.
- Knudson AG. (November **2001**). "Two genetic hits (more or less) to cancer". Nature reviews. Cancer 1 (2): 157–62
- Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E. *Herbs of the Labiatae*. Elsevier Science Ltd, **2004**
- Kris Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD, **2002**. *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. Am J Med 113:S71-88
- Lacroix M, Leclercq G. (**2004**). "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update". Breast Research and Treatment 83 (3): 249–289. DOI:10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc.
- Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. (**2006**). "p53 and breast cancer, an update". Endocrine, Related, Cancer 13 (2):293325. DOI:10.1677/erc.1.01172. PMID 16728565.
- Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. *Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK*. Toxicol Appl Pharmacol., 203(2):124–131, **2005**.
- Levenson AS, Jordan VC. (**1997**). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line". Cancer Research 57 (15): 3071–3078.

- Li F, Ye L, Lin SM, Leung LK. *Dietary flavones and flavonones display differential effects on aromatase (CYP19) transcription in the breast cancer cells MCF-7*. Mol Cell Endocrinol. 2011 Sep 15;344(1-2):51-8. Epub **2011** Jun 30.
- López-Lázaro M. (2009). "Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin". Mini.Rev.Med.Chem. 9 (1):3159.
- López-Lázaro M. (2010). "A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy". Molecular medicine 16 (3–4): 144–153.
- Ma JY, Wang ZT, Xu LS, Xu GJ. A sesquiterpene lactone glucoside from *Ixeris denticulata* f. *pinnatifidata*. Phytochemistry. **1999** Jan;50(1):113-5.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr. **2004** 79:727-747.
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, & Sakurai, H. (1995). *Active oxygen scavenging activity of plant extracts*. Biological and Pharmacological Bulletin, 18(1), 162–166.
- Medew Julia (30 September **2010**). "Study finds big risk of cancer in the family". Sydney Morning Herald. Retrieved 30 September 2010.
- Mirvish SS. *Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems*. In: *Inhibition of tumor induction and development*. Zedeck MS, Lipkin M eds. Plenum: New York, USA, **1981**.
- Ngo SN, Williams DB, Head RJ. *Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives*. Crit Rev Food Sci Nutr. **2011** Dec;51(10):946-54.
- Nogata Yoichi, Ohta Hideaki, Ishii Toshinao, Sekiya Keizo. *Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-O-rutinoside) as an arachidonate lipoxygenase inhibitor from Lumie fruit (Citrus lumia) and its distribution in Citrus species*. Journal of the Science of Food and Agriculture, Volume 87, Number 1, 15 January **2007** , pp. 82-89(8)
- Perry NS, Bollen C, Perry EK, Ballard C. *Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial*. Pharmacol Biochem Behav. **2003** Jun;75(3):651-9
- Petersen M, Simmonds MSJ. (2003) *Rosmarinic acid*. Phytochemistry 61: 121-125

- Pizzale L, Bortolomeazzi R, Vichi S, Uberegga, E. & Conte, LS. (2002). *Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and oregano (Origanum onites and O. intercedens) extracts related to their phenolic compound content*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 1645–1651
- Ramos AA, Azqueta A, Pereira-Wilson C, Collins AR. *Polyphenolic compounds from Salvia species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells*. J Agric Food Chem. 2010 Jun 23;58(12):7465-71.
- Rasnick D, Duesberg PH. (1999). *"How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer"*. The Biochemical journal 340 (3): 621–30.DOI:10.1042/0264-6021:3400621. PMC 1220292. PMID 10359645.
- Raymond M. Harley, Sandy Atkins, Andrey L. Budantsev, Philip D. Cantino, Barry J. Conn, Renée J. Grayer, Madeline M. Harley, Rogier P.J. de Kok, Tatyana V. Krestovskaja, Ramón Morales, Alan J. Paton, and P. Olof Ryding. 2004. *"Labiatae"* pages 167-275. In: Klaus Kubitzki (editor) and Joachim W. Kadereit (volume editor). The Families and Genera of Vascular Plants volume VII. Springer-Verlag: Berlin; Heidelberg, Germany.ISBN 978-3-540-40593-1
- Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. *Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development*. Cancer Res. 1987 47:5340-5346.
- Reichling J, Nolkemper S, Stintzing FC, Schnitzler P. *Impact of ethanolic lamiaceae extracts on herpes virus infectivity in cell culture*. Forsch Komplementmed. 2008 Dec;15(6):313-20.
- Ross DT, Perou CM. (2001). *"A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines"*. Diseases Markers 17 (2): 99–109.
- Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub MP. *Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin*. Arch Biochem Biophys. 1990 283:107-113.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2005;45(4):287-306

- Scheckel KA, Degner SC, Romagnolo DF. *Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines*. J Nutr. **2008** Nov;138(11):2098-105.
- Schwarz K, Ternes W. *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes*. Z Lebensm Unters Forsch. **1992** Aug;195(2):99-103
- Sezik E. & Yesilada, E. (1999). *Essential oils*. In N. Krimer, & A. Mat (Eds.), Honour of Prof. Dr. K. H. C. Baser on his 50th birthday (pp. 98). Turkey: Eskisehir.
- Shahidi F, Naczki M. *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, **1995**.
- Shereiqli I, Reddy P, Brenner DE. *Chemoprevention: general perspective*. Crit Rev Oncol Hem, 33: 157-167, **2000**.
- Shukla Y, Kumar Pal S. *Dietary cancer chemoprevention: An overview*. Inter J Jum Gen, 4: 265-276, **2004**.
- Simon JE, AF Chadwick and LE Craker. **1984**. *Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone*. Archon Books, 770 pp., Hamden, CT.
- Simon JE, AF. Chadwick and LE. Craker. **1984**. *Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone*. Archon Books, 770 pp., Hamden, CT.
- Skoula M, Abbes J, Johnson C. *Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of Salvia fruticosa mill growing in Crete*. Biochemical Systematics and Ecology, 28:551-561, **2000**.
- Smith JJ, Tully P, Padberg RM. *Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy*. Sem Oncol Nurs, 21: 243-251, **2005**.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". Journal of the National Cancer Institute 51 (5): 1409–1416.

- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids)*. Fed Proc. 35 (1976) 1332-1338.
- Sporn MB, Suh N. *Chemoprevention of cancer*. Carcinogenesis vol.21 no3 pp525-530, **2000**
- Sporn MB. **1996**. *The war on cancer*. Lancet, 347,1377-1381.
- Stoddard Fr, 2<sup>nd</sup>, Brooks AD, Eskin BA, Johannes GJ. (2008). *"Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: evidence for an anti-estrogen effect of iodine"*. International journal of medical sciences 5 (4): 189–96. PMC 245297
- Sur S V, Tuljupa FM, & Sur LI. (1991) . *Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants*. Journal of Chromatography, 542,451-458.
- Surch Y-J. *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*. Nat Rev Cancer, 3:768–80, **2003**.
- Sutton John (2004). *The Gardener's Guide to Growing Salvias*. Workman Publishing Company. p. 17. ISBN 978-0-88192-671-2.
- Tang MK, Ren DC, Zhang JT, Du GH. *Effect of salvianolic acids from Radix Salviae miltiorrhizae on regional cerebral blood flow and platelet aggregation in rats*. Phytomedicine. **2002** Jul;9(5):405-9
- Theoharides (2009). *Luteolin as a Therapeutic Option for Multiple Sclerosis*". Journal of Neuroinflammation 6 (1): 29. doi:10.1186/1742-2094-6-29
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN. *Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden*. J Sci Food Agric. **2000** 80:1073–1080.
- Venturi, S. (2001). *"Is there a role for iodine in breast diseases?"*. The Breast 10 (5): 379–382.
- Wang HY, Quan K, Jiang YL, Wu JG, Tang XW. *Effect of Luteolin and its combination with chemotherapeutic drugs on cytotoxicity of cancer cells*. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. **2010** Jan;39(1):30-6.
- Wang QL, Wu Q, Tao YY, Liu CH, El-Nezami H. *Salvianolic acid B modulates the expression of drug-metabolizing enzymes in HepG2 cells*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. **2011** Oct;10(5):502-8.



- Wang T, Zhang JC, Chen Y, Huang F, Yang MS, Xiao PG. *Comparison of antioxidative and antitumor activities of six flavonoids from Epimedium koreanum*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. **2007** Apr;32(8):715-8.
- Wattenberg LW. *Chemoprevention of cancer* (1985) Cancer Res, 45:1-8
- "World Cancer Report". International Agency for Research on Cancer. **2008**. Retrieved 2011-02-26. (cancer statistics often exclude non-melanoma skin cancers such as basal cell carcinoma which though very common are rarely fatal)
- Yinrong Lu and L. Yeap Foo (1999). *Rosmarinic acid derivatives from Salvia officinalis*. Phytochemistry 51:91-94
- Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. *Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action*. Carcinogenesis. **1991** 12:2109-2114
- Zhang SH, Su J, Zhen YS. *Salvianolic acid A inhibits nucleoside transport and potentiates the antitumor activity of chemotherapeutic drugs*. Yao Xue Xue Bao. **2004** Jul;39(7):496-9.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. *A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure*. Proc Natl Acad Sci USA. **1992** 89:2399-2403.
- Zhao G, Qin GW, Wang J, Chu WJ, Guo LH, (2010). *Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of Perilla frutescens (L.) Britt*. Neurochemistry international 56 (1): 168–76
- Zheng W, Wang S Y. *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. J Agric Food Chem **2001** Nov;49(11):5165-70
- Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de The H. *How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic*. Nat Rev Cancer 2:705-713, **2002**